

Tesis Doctoral

Estudios biológicos y enzimáticos en *Chlorella kessleri* (trebouxiphyceae, chlorophyta)

Juárez, Angela Beatriz

2003

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Juárez, Angela Beatriz. (2003). Estudios biológicos y enzimáticos en *Chlorella kessleri* (trebouxiphyceae, chlorophyta). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Juárez, Angela Beatriz. "Estudios biológicos y enzimáticos en *Chlorella kessleri* (trebouxiphyceae, chlorophyta)". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIOS BIOLÓGICOS Y ENZIMÁTICOS
EN *CHLORELLA KESSLERI*
(TREBOUXIOPHYCEAE, CHLOROPHYTA)

Tesis de Doctorado en Cs. Biológicas
Autor:

Lic. Ángela Beatriz Juárez

Directores:

Dra. María Susana Vigna

Dra. María del Carmen Ríos de Molina

*Laboratorio de Ficología y
Cultivo Experimental de Microalgas
Laboratorio de Enzimología y Estudios Metabólicos*

*Departamento de Biodiversidad y
Biología Experimental
Departamento de Química Biológica*

2003

3619

*A los tres hombres de mi vida, sin los cuales ella no
tendría sentido:*

Agus, mi "monito" adorado

Nico, mi "hombrecito" maravilloso

Jorge, el amor de mi vida

ÍNDICE

Resumen	1
Summary	3
Abreviaturas	5
Presentación	7
Capítulo I: <i>Chlorella kessleri</i> y el género <i>Chlorella</i>	
I.1. Introducción	9
I.2. Materiales y Métodos	22
I.2.1. Características de la zona de muestreo	22
I.2.2. Trabajo de muestreo	22
I.2.3. Medios de cultivo	24
I.2.4. Aislamiento, purificación y cultivo	26
I.2.5. Consideraciones generales	28
I.2.6. Estudios morfológicos	29
I.2.7. Estudios ultraestructurales	30
I.2.8. Estudios quimiotaxonómicos	31
I.2.9. Estudios de la composición química de la pared celular	35
I.3. Resultados	37
I.3.1. Estudios morfológicos	37
I.3.2. Estudios ultraestructurales	46
I.3.3. Estudios quimiotaxonómicos	49
I.3.4. Estudios de la composición química de la pared celular	52
I.4. Discusión	53
I.5. Conclusiones	58
Capítulo II: Estudios de enzimas involucradas en la síntesis de clorofila	
II.1. Introducción	59
II.2. Materiales y Métodos	70
II.2.1. Caracterización del crecimiento de <i>C. kessleri</i> en cultivo	70
II.2.2. Extractos enzimáticos	70
II.2.3. Estudios sobre la UroD	73
II.2.3.1. Separación y cuantificación de las porfirinas metil-éster por HPLC	73
II.2.3.2. Ensayos de actividad UroD	73
II.2.3.3. Actividad UroD en función del estado de crecimiento de los cultivos	74
II.2.3.4. Purificación parcial de la UroD	74
II.2.3.5. Efecto de las condiciones de ensayo y del almacenamiento sobre la actividad UroD	75
II.2.3.6. Energía de activación de la reacción catalizada por la UroD	75
II.2.3.7. Inmunodetección (Western Blot)	76
II.2.4. Estudios sobre la síntesis de ALA	77
II.2.4.1. Ensayos de la actividad ALAS	77
II.2.4.2. Cuantificación del ALA formado	78
II.2.4.3. Ensayos de la actividad DOVAT	78

II.3. Resultados	80
II.3.1. Caracterización del crecimiento de <i>C. kessleri</i> en cultivo	80
II.3.2. Extractos enzimáticos	82
II.3.3. Estudios sobre la UroD	83
II.3.3.1. Separación de los productos de la actividad UroD y de la clorofila por HPLC	83
II.3.3.2. Ensayos de actividad UroD	89
II.3.3.3. Actividad UroD en función del estado de crecimiento de los cultivos	89
II.3.3.4. Purificación parcial de la UroD	90
II.3.3.5. Efecto de las condiciones de ensayo y del almacenamiento sobre la actividad UroD	92
II.3.3.6. Energía de activación	98
II.3.3.7. Inmunodetección (Western Blot)	98
II.3.4. Estudios sobre la síntesis de ALA	100
II. 4. Discusión	102
II.4.1. Caracterización del crecimiento de <i>C. kessleri</i> en cultivo	102
II.4.2. Estudio sobre las enzimas regulatorias claves de la síntesis de tetrapirroles en <i>C. kessleri</i>	102
II.4.3. Estudios sobre la UroD	103
II.4.4. Estudios sobre la síntesis de ALA	107
II. 5. Conclusiones	111
Capítulo III: Potenciales aplicaciones biotecnológicas y ecotoxicológicas	
Presentación	113
Sección A: Bioensayos de toxicidad de metales	
III. A. 1. Introducción	114
III. A. 2. Materiales y Métodos	119
III.A.2.1. Estudios del efecto del cobre sobre <i>C. kessleri</i>	119
III.A.2.2 Extractos enzimáticos	120
III.A.2.3. Determinación de la actividad UroD	120
III.A.2.4. Análisis estadísticos	121
III. A. 3. Resultados	122
III. A. 4. Discusión	125
III. A. 5. Conclusiones	133
Sección B: Bioensayos de toxicidad de xenobióticos	
III. B. 1. Introducción	134
III. B. 2. Materiales y Métodos	137
III.B.2.1. Estudios del efecto del HCB sobre <i>C. kessleri</i>	137
III.B.2.2 Extractos enzimáticos	137
III.B.2.3. Determinación de la actividad UroD	138
III.B.2.4. Análisis estadísticos	138
III. B. 3. Resultados	139
III. B. 4. Discusión	144
III. B. 5. Conclusiones	151
Sección C: Producción de sustancias antimicrobianas	
III. C. 1. Introducción	153
III. C. 2. Materiales y Métodos	159
III.C.2.1. Actividad antimicrobiana del agua de la Laguna Verde y de sobrenadantes de cultivos axénicos de <i>C. kessleri</i> en fase exponencial y estacionaria de crecimiento..	159

III.C.2.2. Actividad antimicrobiana de sobrenadantes de cultivos axénicos de <i>C. kessleri</i> en fase estacionaria de crecimiento	160
III.C.2.3. Ensayos de actividad antimicrobiana	162
III.C.2.4. Análisis parcial de la composición de los extractos	163
III. C. 3. Resultados	167
III.C.3.1. Actividad antimicrobiana del agua de la Laguna Verde y de sobrenadantes de cultivos axénicos de <i>C. kessleri</i> en fase exponencial y estacionaria de crecimiento..	167
III.C.3.2. Actividad biológica de sobrenadantes de cultivos axénicos de <i>C. kessleri</i> en fase estacionaria de crecimiento	170
III.C.3.3. Análisis parcial de la composición de los extractos	173
III. C. 4. Discusión	177
III. C. 5. Conclusiones	184
Alcances y perspectivas del trabajo	185
Bibliografía	188
Agradecimientos	202

RESUMEN

En este trabajo de tesis, se abordaron estudios sobre distintos aspectos de la biología de una cepa de *Chlorella kessleri*, aislada de la Laguna verde (Complejo Termal Copahue, Neuquén, Argentina), que no había sido estudiada previamente. Se realizó la caracterización morfológica, ultraestructural, bioquímica y fisiológica de esta cepa autóctona y se asignó su correcta identidad taxonómica. La identificación de esta especie constituyó una cita nueva para la Argentina, el segundo registro mundial de la especie en un ambiente natural, y una nueva cita de una especie del género *Chlorella* en un ambiente de origen volcánico. Además, se realizaron estudios enzimáticos, relacionados con los pasos regulatorios claves del camino biosintético de las clorofilas. Se determinaron, por primera vez en *Chlorella kessleri*, las actividades de dos enzimas involucradas en el primer paso regulatorio de este camino (síntesis del primer metabolito, ácido δ -aminolevulínico), detectándose la presencia de actividad de las enzimas δ -aminolevulínico sintetasa y γ,δ -dioxovalerato transaminasa. Se estudió y caracterizó por primera vez en una Chlorophyta y por segunda vez en algas en general, la enzima del segundo paso regulatorio clave del camino (uroporfirinógeno decarboxilasa, UroD). Los estudios realizados sobre la actividad de esta última enzima en función de distintas condiciones (fase de crecimiento del cultivo, pH, temperatura, tiempo de incubación, tiempo de almacenamiento, concentración de proteínas, concentración de sustrato) permitieron caracterizar la UroD de *C. kessleri* y sentar las bases para la determinación de su actividad en las microalgas. Adicionalmente, se llevó a cabo la purificación parcial de esta enzima y se estableció que su estructura correspondería a un heterodímero de $ca. 116 \pm 7$ kDa constituido por dos monómeros de $ca. 72 \pm 7$ kDa y 66 ± 5 kDa de masa molecular.

Al mismo tiempo, se estudiaron dos aspectos importantes relacionados con la biología aplicada de las microalgas:

- 1) La potencial aplicación de esta cepa y alguna de sus propiedades como índice de contaminación ambiental con metales y xenobióticos, analizando el efecto de un metal pesado (cobre) y un hidrocarburo aromático polihalogenado (hexaclorobenceno) sobre la actividad de la enzima UroD. Se observó que, en las condiciones ensayadas, *C. kessleri* tolera concentraciones de cobre más elevadas que las informadas para otras especies del género (no se registró inhibición de la tasa de crecimiento) y que este metal afecta principalmente el contenido de clorofila y la actividad de la enzima UroD.

Mientras que el hexaclorobenceno afecta principalmente el crecimiento de la especie y su actividad UroD a tiempos cortos de exposición, existiendo una recuperación a tiempos más largos. Los resultados obtenidos muestran que la determinación de la actividad UroD puede constituir un biomarcador de la contaminación reciente con hidrocarburos aromáticos polihalogenados y de la toxicidad de niveles de cobre que no alcanzan a producir efectos ponderables sobre el crecimiento algal.

- 2) La potencialidad de esta cepa como fuente de compuestos biológicamente activos, evaluando la actividad antimicrobiana de extractos extracelulares de cultivos axénicos de *C. kessleri* frente a 11 cepas de microorganismos patógenos. Estos extractos mostraron actividad inhibitoria frente a todas las cepas ensayadas, tres de las cuales corresponden a bacterias altamente patógenas y resistentes a las drogas antibacilares de uso clínico actual. Los resultados obtenidos muestran la potencialidad de los cultivos de *C. kessleri* para la extracción, aislamiento e identificación de metabolitos farmacológicamente activos que puedan ser producidos y utilizados en la industria farmacéutica.

SUMMARY

This dissertation deals with the study of different biological aspects of a *Chlorella kessleri* strain isolated from Laguna Verde (Complejo Termal Copahue, Neuquén, Argentina). It was carried out the morphological, ultrastructural, biochemical and physiological characterization and the correct taxonomical determination of this autochthon strain. This species is a new record for Argentina, the second record in the world and a new specific recording of the genera for volcanic environments. In addition enzymatic studies related with the regulatory steps of the chlorophyll biosynthetic pathway were made. For the first time in *C. kessleri* the activity of two enzymes related with the first regulatory step of this pathway were studied. Evidences of the activity of the enzymes δ -aminolevulinic synthase and γ,δ -dioxovalerate transaminase were detected.

For the first time in a green algae (Chlorophyta) and for second time in an algae, it was studied and characterized the enzyme uroporphyrinogen decarboxylase (UroD). The studies in the activity of the UroD in different conditions (growing culture phase, pH, temperature, incubation time, storage time, protein concentration and substrate concentration), allow to characterize the enzyme. In addition partially purified enzyme was obtained and it was established that UroD is an heterodimer of $ca. 116 \pm 7$ kDa formed by two monomers of $ca. 72 \pm 7$ kDa and 66 ± 5 kDa.

At the same time two important aspects related with the applied biology of the microalgae were studied:

- 1) The potential application of this strain as an index of heavy metal and xenobiotic environmental contamination.
- 2) The potential usage of this strain as an source of products with biological activity.

Analyzing the effect of the copper and hexachlorobenzene on the *C. kessleri* strain it was observed that this species has a higher rank of tolerance for this heavy metal than other species of the same genera. This metal affect the chlorophyll content and the activity of the UroD.

On the other hand, the hexachlorobenzene affect the growing of the species and the UroD activity in short exposure times. The results show that the activity of the UroD it would be an excellent tool to establish the levels of contamination due to HCB or copper contamination. In

the other aspect *C. kessleri* extracellular extracts were tested against 11 pathogenic strains, testing its inhibitory properties, the results were positive in all cases. The results show *C. kessleri* cultures potential as a source of pharmacological substance.

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL TEXTO

ALA: ácido δ aminolevulínico
 ALAS: ALA-sintetasa
 ATS: medio triptona de soja agarizado
 BB: azul de bromofenol
 BBM: Bold's Basal Medium
 BBM-N: medio BBM sin nitrato de sodio
 BBMPL: medio BBM con extracto de levadura y peptona hidrolizada
 BG: verde de bromocresol
 BIO: biocromatogramas
 ca.: *circa*
 CGL: cromatografía gas-líquido
 CGL-EM: CGL acoplada a espectrometría de masa
 CI₅₀: concentración que inhibe el crecimiento en un 50%
 COOH: residuo carboxilo
 Copro: coproporfirina
 Coprogen: coproporfirinógeno
 c. s. p.: cantidad suficiente para
 DAB: diaminobenzidina
 DOVA: γ,δ - dioxovalerato
 DOVAT: DOVA-transaminasa
 EA: extracto en acetato de etilo
 EC: extracto etéreo obtenido a partir del sobrenadante del cultivo en fase estacionaria, previamente concentrado a 50°C.
 ED: extracto etéreo obtenido a partir del sobrenadante del cultivo en fase estacionaria, sin concentración previa del mismo.
 EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
 EE: extracto etéreo
 ER: eluido con éter etílico, del sobrenadante del cultivo en fase estacionaria, sembrado en resina de adsorción (amberlite XAD₂)
 GSA: glutamato-1-semialdehído
 GSH: glutation reducido
 HAPs: hidrocarburos aromáticos polihalogenados
 HCB: hexaclorobenceno
 HCB+: cultivos tratados con HCB
 Heptagen: heptacarboxiporfirinógeno
 Hexagen: hexacarboxiporfirinógeno
 HPLC: cromatografía líquida de alta presión
 HR: fracción resistente a hidrólisis con TFA 2N
 HS: fracción soluble en TFA 2N
 I: iodo
 MDA: malondialdehído
 MeOH: metanol
 MeOH+: cultivos tratados con metanol
 P-3,5: membrana con corte en 3.500 de peso molecular
 P-10: membrana con corte en 10.000 de peso molecular
 PBG: porfobilinógeno
 Pentagen: pentacarboxiporfirinógeno5

PND: producto no dializable (en la extracción de componentes de la pared celular)
Proto: protoporfirina
Protogen: protoporfirinógeno
RB: rodamina B
 R_f : distancia recorrida por una muestra/distancia recorrida por el solvente (o por frente coloreado)
SAG: Colección de cultivos de la Universidad de Göttingen, Alemania
SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida, con dodecil sulfato de sodio
SSA: saturación con sulfato de amonio
Tasa de crecimiento: $\mu = (\ln N_f - \ln N_i)/\text{día}$, siendo N_i y N_f el número de células/ml inicial y final, respectivamente.
TBA: ácido tiobarbitúrico
TFA: ácido trifluoracético
TLC: cromatografía en placa delgada
Tris: trihidroxietilamino metano
TTBS: buffer TRIS-HCl conteniendo Tween y sodio
UBBM: medio BBM con urea
Uro: uroporfirina
Urogen: uroporfirinógeno
USEPA: United States Environmental Protection Agency
UTEX: Universidad de Texas
18S rARN: ARN ribosomal de la subunidad 18S

PRESENTACIÓN

Durante un relevamiento de distintos cuerpos de agua termales de la provincia del Neuquén, se destacaba el color verde intenso que presentaban las aguas de la Laguna Verde (Complejo Termal Copahue). El análisis preliminar de las muestras, indicó que esa coloración se debía a la presencia de una alta concentración de una microalga verde perteneciente al género *Chlorella* Beijerinck (1890) que no correspondía a ninguna de las especies citadas hasta ese momento para la Argentina. La alta dominancia de este organismo en un cuerpo de agua mesotermal con características muy particulares, impulsó el inicio de investigaciones sobre las características biológicas de esta especie.

El género *Chlorella* ha sido muy utilizado para estudiar diversos aspectos de la biología de los organismos fotosintéticos y es una de las microalgas más frecuentemente usadas, tanto en investigaciones básicas como en biotecnología. A lo largo de casi 100 años, se han aislado y cultivado representantes de este género a partir de muestras de distintos ambientes y actualmente hay una gran diversidad de cepas en las colecciones de cultivo más importantes del mundo. Sin embargo, dada la simplicidad de su hábito, los ficólogos han encontrado en este género una gran dificultad para aplicar los criterios morfológicos de clasificación, por lo cual, la quimiotaxonomía ha contribuido a la delimitación de sus especies.

A pesar de que las porfirinas y sus derivados desempeñan una importante función en la bioquímica de los seres vivos, no han sido profundamente estudiadas en *Chlorella*. Estas, forman parte de la estructura de pigmentos tales como la clorofila y el hemo y también están presentes en una gran variedad de otras biomoléculas de vital importancia (citocromos, vitamina B₁₂ y grupos prostéticos de hemoproteínas).

Los principales pasos regulatorios del camino biosintético del hemo y de las clorofilas, se encuentran en el comienzo del camino, que es la síntesis del ácido δ -aminolevulínico (ALA), y en el punto previo a su ramificación, que es catalizado por la enzima uroporfirinógeno decarboxilasa (UroD). La regulación de la síntesis de clorofila está involucrada en el balance entre la producción y utilización de productos fotosintéticos, del cual depende la síntesis de metabolitos y el crecimiento de las algas. Los estudios sobre las enzimas involucradas en la biosíntesis de este compuesto pueden contribuir a un mejor entendimiento del metabolismo algal y al manejo de la optimización de los cultivos de microalgas.

Por otra parte, actualmente se ha acrecentado el interés de los investigadores por la biología aplicada de las microalgas en cultivo, focalizándolo en la aplicación de las microalgas como bioindicadores de contaminación de aguas y en su potencial como fuente de compuestos de interés nutricional y farmacológico. En relación con el primer aspecto, hoy en día existe un aumento alarmante de contaminación en todos los niveles y específicamente, en el ambiente acuático. Ello ha llevado a aumentar el interés por el estudio del efecto de diversos contaminantes sobre las microalgas. En relación con el segundo aspecto, el organismo en estudio fue aislado de un ambiente cuyas aguas son utilizadas con fines terapéuticos, como el tratamiento de afecciones dermatológicas del tipo de la psoriasis, candidiasis, etc. Por lo que cabe plantearse que podría estar relacionado con los efectos curativos de las aguas, a través de la producción de sustancia biológicamente activas.

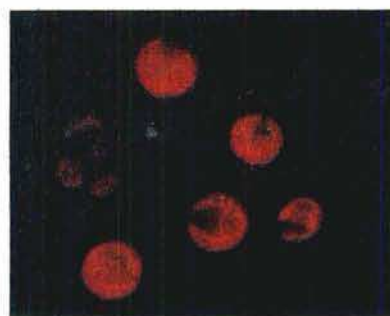
Sobre la base de lo expuesto hasta aquí, se consideró relevante estudiar distintos aspectos de la biología de una cepa autóctona del género *Chlorella* que no había sido caracterizada hasta el presente. Los estudios realizados en este trabajo de tesis se presentan a lo largo de tres capítulos y sus objetivos fueron:

- Estudiar los caracteres morfológicos, ultraestructurales, bioquímicos y fisiológicos de la cepa, que permitieran su caracterización y su correcta determinación taxonómica.
- Estudiar la actividad de dos enzimas involucradas en el primer paso regulatorio del camino biosintético de las clorofilas (ALA sintetasa y dioxovalerato transaminasa) y estudiar y caracterizar la enzima del segundo paso regulatorio clave (UroD).
- Estudiar dos aspectos importantes de la biología aplicada de las microalgas:
 - 1) La potencial aplicación de esta cepa como indicadora de contaminación ambiental con metales y xenobióticos, analizando el efecto de los mismos sobre la actividad de la UroD, enzima clave del camino biosintético de la clorofila.
 - 2) La potencialidad de esta cepa como fuente de compuestos biológicamente activos, evaluando la actividad antimicrobiana de extractos extracelulares frente a diversos microorganismos patógenos.



CAPÍTULO I

***CHLORELLA KESSLERI* FOTT et NOVÁKOVÁ Y EL GÉNERO *CHLORELLA* BEIJERINCK**



I. 1. INTRODUCCIÓN

Chlorella Beijerinck fue una de las primeras microalgas aisladas en cultivos puros y los miembros de este género se encuentran entre las algas verdes unicelulares más estudiadas. Desde que Warburg (1919) introdujo los cultivos masivos de *Chlorella* en el estudio de la fotosíntesis, esta microalga ha servido como modelo para las investigaciones sobre la fisiología y bioquímica de los organismos fotosintéticos (Huss *et al.* 1999).

En los últimos años, el uso de cultivos de *Chlorella* se ha extendido al campo de la biología aplicada y los esfuerzos se dirigieron, principalmente, a su utilización como fuente de alimento, como biofertilizante, para el tratamiento de efluentes cloacales y residuos industriales y para la obtención de nuevos fármacos (Borowitzka 1995; Apt y Behrens 1999). En este sentido, se han desarrollado suplementos nutricionales a partir de biomasa seca o extractos celulares (Lee 1997; Yamaguchi 1997) y además, es uno de los géneros cultivados para acuicultura (Apt y Behrens 1999). También se ha demostrado que extractos celulares y extracelulares de *Chlorella* poseen actividad antibacteriana y antifúngica (Accorinti 1981; Borowitzka y Borowitzka 1988; Romero López y Pérez Hernández 1999). Sin embargo, en la industria farmacéutica, a diferencia de lo que ocurre con el desarrollo de productos nutricionales, aún no se ha llegado a la producción y comercialización de compuestos bioactivos provenientes de *Chlorella*, ni de las microalgas en general (Apt y Behrens 1999).

A pesar de la gran diversidad de investigaciones y aplicaciones relacionadas con *Chlorella*, la taxonomía de este género ha sido caótica por mucho tiempo. La falta de diferencias evidentes entre los caracteres morfológicos, combinada con una reproducción exclusivamente asexual, ha causado considerables problemas en la elección de los caracteres de valor taxonómico y, por consiguiente, en la identificación de sus especies (Cozzolino *et al.* 1999). Gran cantidad de trabajos experimentales que se realizan y se siguen realizando en el género *Chlorella*, utilizan cepas de diferentes orígenes que se encuentran depositadas en distintas colecciones de cultivo, como la Colección de Cultivos de Algas y Protozoos de Cambridge, Reino Unido (CCAP), la Colección de Cultivos de la Universidad de Texas Austin, USA (UTEX), la Colección de Cultivos de Bethesda Maryland, USA (Bethesda) y la Colección de Cultivos de la Universidad de Göttingen, Alemania (SAG). Frecuentemente, esas cepas están identificadas con diferentes nombres en cada colección (aún cuando hayan sido transferidas de una

colección a otra) y esa nomenclatura irregular causa grandes inconvenientes en la comparación de los resultados de los trabajos llevados a cabo por distintos laboratorios.

Como se señaló antes, la falta de caracteres morfológicos conspicuos dificulta el trabajo taxonómico clásico y, por lo tanto, muy pocos estudios se han basado únicamente en su morfología (Fott y Nováková 1969; Kalina y Punčocharová 1987). Debido a esto, se aplicaron numerosos métodos para aclarar la taxonomía de *Chlorella*. Muchos de ellos consideraron los requerimientos nutricionales de las cepas, cultivándolas bajo condiciones autotróficas o heterotróficas (Shrift y Sproul 1963; Shihira y Krauss 1965) y otros se basaron en la aplicación de estrategias de clasificación numérica, intentando llegar a conclusiones taxonómicas (Cullimore 1969; DaSilva y Gyllenberg 1972).

En su monografía del género *Chlorella*, Fott y Nováková (1969) combinaron caracteres morfológicos y estructurales (como tamaño y forma de las células, número de autosporas, forma del cloroplasto, presencia o ausencia de pirenoide) con algunas características fisiológicas, llegando a describir nueve especies y seis variedades. Los esfuerzos de estos autores para combinar este tipo de caracteres pueden considerarse como los primeros pasos hacia una clasificación natural del género *Chlorella*. Sin embargo, el sistema más reconocido y práctico para la delimitación de especies en este género resultó ser un esquema de clasificación quimiotaxonómica que combina caracteres bioquímicos y fisiológicos, propuesto por Kessler y Soeder (1962) y Kessler (1984 y 1992).

La quimiotaxonomía establece que una sustancia biológica es una expresión de características genéticas de la especie. Sobre esta base, muchas sustancias como lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y metabolitos secundarios han sido analizadas y consideradas como marcadores quimiotaxonómicos (Takeda 1993). Si bien la quimiotaxonomía tiene su más larga tradición en la bacteriología, también ha desempeñado un rol importante dentro de la ficología, principalmente en la separación de grandes categorías taxonómicas. Además, ha contribuido con la sistemática de algas verdes en dos aspectos: a) proveyendo caracteres valiosos para la delimitación de especies de microalgas morfológicamente mal definidas y b) dando evidencias básicas de las relaciones filogenéticas entre distintos taxa (Kessler 1984).

La observación en laboratorio de que dos propiedades bioquímicas como la actividad hidrogenasa y la producción de carotenoides secundarios bajo condiciones de deficiencia de

nitrógeno, se encontraban en algunas pero no en todas las cepas de *Chlorella*, llevaron al desarrollo de un nuevo enfoque en la taxonomía de este género (Kessler 1984).

Con el transcurso de los años, la aplicación de 10 caracteres bioquímicos y fisiológicos fácilmente determinables, permitió la caracterización y delimitación de 14 especies de *Chlorella* (Kessler 1976 y 1982). Estos caracteres son:

- Presencia de actividad hidrogenasa
- Producción de carotenoides secundarios
- Liquefacción de gelatina
- Hidrólisis de almidón
- Fermentación de glucosa a lactato
- Uso de nitrato como fuente de nitrógeno
- Requerimiento de tiamina
- Tolerancia a la acidez (pH límite)
- Tolerancia a la sal (%NaCl límite)
- Límites de temperatura para su desarrollo.

La caracterización bioquímica de las especies también está apoyada por la determinación de caracteres morfológicos especie-específicos que ya habían sido delimitados por Fott y Nováková (1969). El estudio de los diez caracteres quimiotaxonómicos mencionados, permitió establecer que:

- La enzima hidrogenasa, la cual es activa sólo en condiciones estrictamente anaerobias (Kessler 1974), puede ser un relictos de fases de vida tempranas anaerobias y es de especial significancia taxonómica (Horner *et al.* 2002). Se encontró que ciertas cepas de *Chlorella* la contienen, mientras que otras, por no contenerla, son incapaces de metabolizar hidrógeno molecular (Kessler 1984). Debido a ello, la presencia o ausencia de esta enzima puede usarse como un carácter bioquímico para la determinación de las especies de este género.
- Cierta número de algas, particularmente las formas cocoides de las Chlorophyta, depositan carotenoides fuera del cloroplasto bajo condiciones de deficiencia de

nutrientes, principalmente de nitrógeno, y la coloración parda o naranja que toman sus células, es de valor taxonómico (Kessler 1976; Hanagata y Dubinsky 1999).

- La capacidad de hidrolizar gelatina es especie-específica en el género *Chlorella* (Soeder 1963; Kessler 1976).
- Algunos microorganismos secretan α y β amilasas, enzimas extracelulares capaces de convertir el almidón en moléculas difusibles. De acuerdo con los ensayos realizados por un gran número de investigadores, la presencia de amilasas también resulta ser un carácter útil en la clasificación específica de este género (Kessler 1978 y 1984).
- Algunas especies de *Chlorella* fermentan glucosa a lactato bajo condiciones anaerobias (Vinayakumar y Kessler 1975).
- Sólo una especie, *C. protothecoides*, es incapaz de usar nitrato como fuente de nitrógeno y requiere tiamina para su crecimiento (Kessler y Zweier 1971).
- La tolerancia a la acidez es especie-específica y los límites de crecimiento van desde pH 2 en *C. saccharophila* a pH 6 en *C. homosphaera*.
- La tolerancia a la sal es especie-específica y los límites de crecimiento van desde menos del 1% de NaCl en *C. homosphaera* hasta 5% de NaCl en *C. luteoviridis*.
- Mientras la mayoría de las cepas tienen su límite de crecimiento a 30-32° C, la especie *C. sorokiniana* es termofílica y es capaz de crecer a temperaturas por encima de 38-42° C.

Todos estos datos se utilizaron para confeccionar una clave quimiotaxonómica del género (Tabla 1) (Kessler 1978) y posteriormente se llevaron a cabo una serie de trabajos que examinaron la correcta identificación de las cepas de *Chlorella* de la Colección de la SAG (Kessler 1984) y de la UTEX, ampliando la caracterización de 14 a 19 taxa (Tabla 2) (Kessler y Huss 1992; Huss *et al.* 1999).

Tabla 1. Clave para la identificación de 14 especies de *Chlorella*, basada en caracteres bioquímicos y fisiológicos.

-
1. a) Presenta actividad hidrogenasa en anaerobiosis
 2. a) Sintetiza carotenoides secundarios bajo deficiencia de nitrógeno
 3. a) Licua gelatina
 4. a) Hidroliza almidón: *C. fusca* var. *vacuolata*
 4. b) No hidroliza almidón: *C. fusca* var. *fusca*
 3. b) No licua gelatina
 4. a) Límites de crecimiento a pH 4,5 y a 3% NaCl: *C. fusca* var. *rubescens*
 4. b) Límites de crecimiento a pH 6 y a < 1% NaCl: *C. homosphaera*
 2. b) No sintetiza carotenoides secundarios bajo deficiencia de nitrógeno
 3. a) Límite de crecimiento a pH 3: *C. kessleri*
 3. b) Límite de crecimiento a pH 4 - 4,5, termofílica (crecimiento a 38° C): *C. sorokiniana*
 1. b) No presenta actividad hidrogenasa en anaerobiosis
 2. a) Sintetiza carotenoides secundarios bajo deficiencia de nitrógeno: *C. zofingiensis*
 2. b) No sintetiza carotenoides secundarios bajo deficiencia de nitrógeno
 3. a) No reduce nitrato, requiere tiamina: *C. protothecoides*
 3. b) Reduce nitrato, no requiere tiamina
 4. a) Límites de crecimiento a pH 2 - 2,5 y a 3 - 4% NaCl: *C. saccharophila*
 4. b) Límites de crecimiento a pH 3 y a 5% NaCl: *C. luteoviridis*
 4. c) Límite de crecimiento a pH 4 - 4,5
 5. a) No hidroliza almidón, límite de crecimiento a 3 - 4% NaCl: *C. vulgaris*
 5. b) Hidroliza almidón, límite de crecimiento a 0 - 1% NaCl: *C. sp* (cepas SAG 211-11r; 211-30)*
 4. d) Límites de crecimiento a pH 5,5 y a 1% NaCl: *C. minutissima*

* Estas dos cepas pertenecen a diferentes especies que sólo pueden distinguirse por la capacidad de fermentar glucosa a lactato. Basado en Kessler (1978).

Tabla 2. Caracteres bioquímicos y fisiológicos de 19 taxa de *Chlorella*.

Especie	Nº de cepas	Hidrog.	Sec. Car.	NO ₃ ⁻	Tiamina	B ₁₂	Manitol	pH	% NaCl	° C
<i>C. vulgaris</i>	20	-	-	+	-	-	-	3,5-4,5	3-4	28-32
<i>C. lobophora</i>	1	-	-	+	-	-	-	4	1	30
<i>C. sorokiniana</i>	17	+	-	+	-	-	-	3,5-5	<1-3	36-42
<i>C. spp. (paramecii)</i>	3	+	-	+(-)	+	+	-	5,5	<1	26-30
<i>C. spp. 211-18</i>	1	+	-	+	-	-	-	5	1	28
<i>C. kessleri</i>	10	+	-	+	-	-	-	2,5-3	1-2	34-36
<i>C. minutissima</i>	2	-	-	+	-	-	-	5,5	1	32
<i>C. protothecoides</i>	16	-	-	-	+	-	-	3,5-4	3-4	28-34
<i>C. ellipsoidea</i>	2	-	-	+	-	-	-	2-3	2	28-30
<i>C. mirabilis</i>	3	-	-	+	-	-	-	4	<1-1	26-28
<i>C. luteoviridis</i>	6	-	-	+	-	-	+	3	3-5	28
<i>C. saccharophila</i>	6	-	-	+	-	-	+	2-3	4-6	26-30
<i>C. saccharophila</i> 211-9b	1	-	-	+	-	-	+	3	3	26
<i>C. homosphaera</i>	1	+	+	+	-	-	-	6	<1	28
<i>C. zofingiensis</i>	3	-	+	+	-	-	-	5-5,5	1	28
<i>C. zofingiensis</i> C-1.2.1 (=SAG 4.80)	1	-	+	+	-	-	-	4,5	1	28
<i>C. fusca</i> var. <i>fusca</i>	1	+	+	+	-	-	-	4	2	34
<i>C. fusca</i> var. <i>rubescens</i>	1	+	+	+	-	-	-	4,5	3	30
<i>C. fusca</i> var. <i>vacuolata</i>	11	+	+	+	-	-	-	3-3,5	3	32-36

Hidr.: actividad hidrogenasa; Sec. car.: producción de carotenoides secundarios; NO₃⁻ : reducción de nitrato; Tiamina: requerimiento de tiamina; B₁₂ : requerimiento de vitamina B₁₂; Manitol: crecimiento sobre manitol; pH: límite de pH tolerado para el crecimiento; %NaCl: % límite tolerado para el crecimiento; °C: temperatura límite tolerada para el crecimiento (en ° C); % GC: % molar de G+C del ADN. Basado en Huss *et al.* (1999).

Una vez establecidas las propiedades bioquímicas y fisiológicas básicas que hicieron posible el desarrollo de una clave quimiotaxonómica (Tabla 1), se sumaron una serie de investigaciones que agregaron más caracteres a ser tenidos en cuenta, como la composición de bases del ADN (Hellmann y Kessler 1974), reacciones serológicas cruzadas (Maruyama 1977; Kummel y Kessler 1980), tolerancia a los metales pesados (Kessler 1985a, 1986 y 1987), crecimiento sobre manitol (Kessler 1987), ultraestructura y composición de la pared celular (Atkinson *et al.* 1972; Takeda 1988a y b, 1991 y 1996) y ultraestructura del pirenoide (Ikeda y Takeda 1995).

El primer reporte sobre la composición química de la pared celular de *Chlorella* fue realizado por Northcote *et al.* (1958) en *C. pyrenoidosa* y luego siguieron una serie de estudios realizados por distintos autores en otras especies (Becker y Shefner 1964; Takeda y Hirokawa 1978 y 1979; Loos y Meindl 1982; Takeda y Hirokawa 1984). La naturaleza química de la pared celular es bastante diferente entre las cepas y parece ser especie-específica, por lo que fue considerada una herramienta útil para su clasificación.

Takeda (1991) clasificó 41 cepas del género *Chlorella* de la SAG, basándose en las propiedades de su pared celular. Estableció que las cepas de *Chlorella* se separan en dos grandes grupos, de acuerdo a los azúcares de su pared rígida (fracción resistente a hidrólisis con ácido trifluoroacético 2N) (Takeda 1988a y b). Un grupo, tiene una pared rígida de N - acetilglucosamina y el otro, una pared rígida de glucosa-manosa. Las cepas con pared rígida de glucosa-manosa resultaron: *C. saccharophila*, *C. luteoviridis*, *C. fusca* var. *vacuolata*, *C. minutissima*, *C. zofingiensis*, *C. protothecoides*, *C. ellipsoidea* y *C. mirabilis*, y las cepas con pared rígida de N - acetilglucosamina: *C. vulgaris*, *C. kessleri* y *C. sorokiniana*. En las paredes celulares de este último grupo, la responsable de su estructura rígida es la quitina. Este compuesto es un polímero de cadena lineal, conformado por residuos de N - acetilglucosamina unidos por enlaces 1→4, que son liberados mediante hidrólisis ácida fuerte y pueden detectarse como único componente de la fracción rígida de la pared celular. Este polisacárido fibrilar es mucho más insolubles en agua y solventes orgánicos y mucho más resistente que la celulosa.

Otros marcadores taxonómicos son la tinción con rojo de rutenio y la anisotropía de la pared celular. Cuando se tratan células vivas de *Chlorella* con rojo de rutenio, la pared celular de algunas especies se tiñe de rojo intenso, mientras que la de otras no. Esta tinción específica fue reportada por primera vez por Kessler y Soeder (1962) y por Soeder (1963), quienes establecieron que el rojo de rutenio teñía las paredes de *C. vulgaris* y *C. ellipsoidea*. Los resultados de los trabajos de Takeda

están de acuerdo con los de esos autores y se estableció que los azúcares de la pared rígida, la tinción con rojo de rutenio y la anisotropía son caracteres válidos para clasificar cepas de *Chlorella*. Es así, que Takeda (1991) elaboró un índice taxonómico de tres pasos compuesto por esos tres marcadores (Figura 1); de esta manera clasificó muchas cepas de *Chlorella* de la SAG y de otras colecciones de cultivos y las reasignó a las especies correspondientes (Takeda 1991 y 1993).

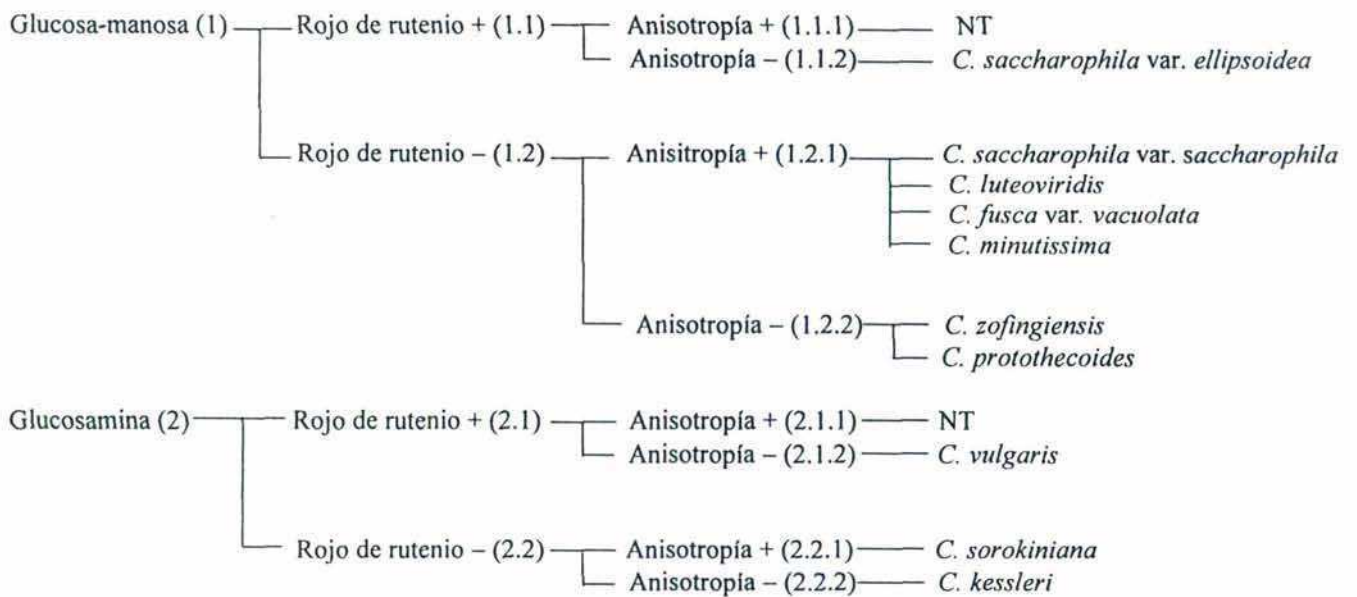


Figura 1. Índice de tres pasos de las especies de *Chlorella* de la SAG. Este índice consiste de tres caracteres: pared rígida de glucosa-manosa (1) o glucosamina (2), tinción con rojo de rutenio positiva (1) o negativa (2), anisotropía positiva (1) o negativa (2). NT: no encontradas en los estudios realizados por Takeda. Basado en Takeda (1991).

Además, este mismo autor, estableció que la comparación de la composición de azúcares de la matriz de hemicelulosa (o matriz amorfa no fibrilar) de la pared celular también es útil para la clasificación de especies de este género. La matriz de hemicelulosa de las cepas pertenecientes al grupo con pared rígida de glucosa - manosa está constituida principalmente por manosa, mientras que la de las cepas pertenecientes al grupo con pared rígida de N - acetilglucosamina, está constituida por ramnosa y galactosa. Además, se encontró fucosa en *C. fusca* y *C. kessleri*, por lo que esta última característica (presencia de fucosa) parece ser útil para la identificación de *C. kessleri* (Tabla 3).

Tabla 3. Clasificación de las especies de *Chlorella* de la Colección de Algas de Göttingen (SAG) sobre la base de la composición de la pared celular.

Azúcares de la pared rígida		Azúcares de la matriz amorfa	Índice	Clasificación
Glucosa-manosa	< 20 % manosa	Principalmente ramnosa	(1.1.2)	<i>C. saccharophila</i> var. <i>ellipsoidea</i>
		Poca ramnosa	(1.2.1)	<i>C. saccharophila</i> var. <i>saccharophila</i>
		Principalmente galactosa con manosa y xilosa	(1.2.1)	<i>C. luteoviridis</i>
	20-30 % manosa	Principalmente manosa con fucosa	(1.2.1)	<i>C. fusca</i> var. <i>vacuolata</i>
		Principalmente manosa con galactosa	(1.2.1)	<i>C. minutissima</i>
		Principalmente manosa con ramnosa	(1.2.2)	<i>C. zofingiensis</i>
		Manosa y galactosa	(1.2.2)	<i>C. protothecoides</i>
Glucosamina	Sin fucosa	(2.1.2)	<i>C. vulgaris</i>	
	Sin fucosa	(2.2.1)	<i>C. sorokiniana</i>	
	Con fucosa	(2.2.2)	<i>C. kessleri</i>	

Basada en Takeda (1991).

Tradicionalmente, el género *Chlorella* ha sido incluido dentro del orden Chlorococcales y la clase Chlorophyceae (Fott y Nováková 1969; Komárek y Fott 1983). Sin embargo, por largo tiempo se ha pensado que este orden no representaba una agrupación natural de organismos (Wilcox *et al.* 1992).

En la década del 90, al introducirse técnicas moleculares en la investigación de la evolución de las algas verdes, comenzó un emocionante período para la ficología. Con el advenimiento de los modernos métodos moleculares, la adquisición de datos a partir de secuencias de ADN se convirtió en una técnica casi rutinaria. El trabajo de Huss y Sogin (1990), basado en la secuenciación del gen que codifica para el ARN ribosomal de la subunidad menor (18S rARN), aportó evidencias de que las Chlorococcales no constituyen un grupo natural, al mostrar que el género *Chlorella* representaría un grupo polifilético en el cual las tres variedades de *C. fusca* corresponderían, en realidad, a diferentes especies del género *Scenedesmus* (Cozzolino *et al.* 1999; Huss *et al.* 1999) (Figura 2). Wilcox *et al.* (1992) también establecieron que los taxa de Chlorococcales autospóricas, para los cuales se encontraban disponibles los datos de secuencias del gen que codifica para el 18S rARN, no formaban un grupo monofilético. Por otra parte, Friedl (1995), observando la posición de las algas cocoides autospóricas en los árboles filogenéticos inferidos a partir del mismo tipo de datos, también detectó el origen polifilético del orden Chlorococcales que, en los esquemas de clasificación tradicional, era asignado a la clase Chlorophyceae (Komárek y Fott 1983).

Friedl (1997), en su revisión del origen de las algas verdes, estableció que las Chlorophyta están subdivididas en al menos cuatro clases: Trebouxiophyceae, Chlorophyceae, Ulvophyceae y Prasinophyceae, y que las algas verdes cocoides, ubicadas tradicionalmente en el orden Chlorococcales, clase Chlorophyceae, en realidad se distribuyen entre varios linajes (aún sin un status taxonómico acordado) dentro de las clases Chlorophyceae y Trebouxiophyceae.

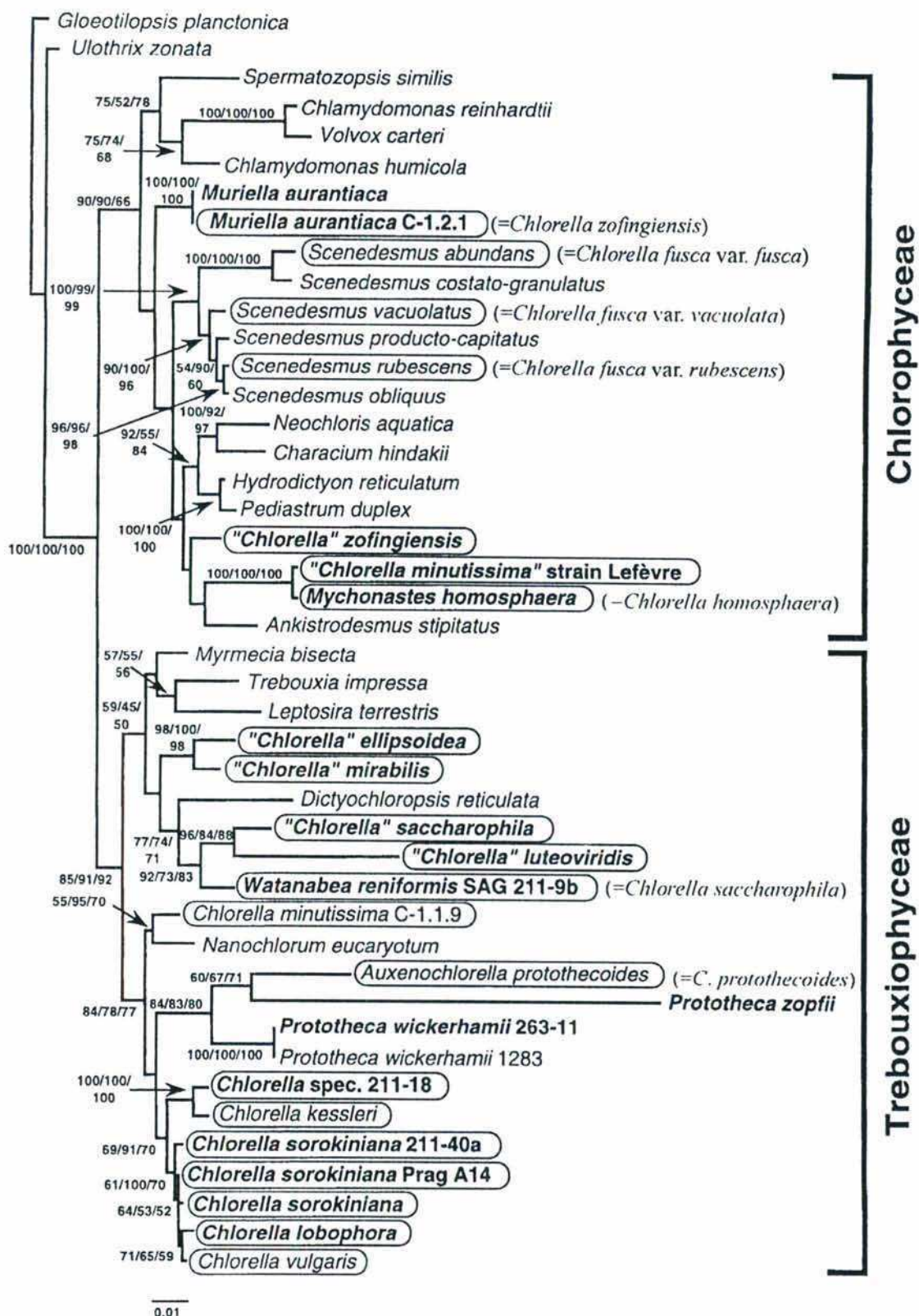


Figura 2. Árbol filogenético inferido a partir de las secuencias que codifican para el 18S rARN, mostrando la polifilia del género *Chlorella sensu lato* dentro de las clases Trebouxiophyceae y Chlorophyceae. Las especies recuadradas, corresponden a los taxa tradicionalmente asignados al género. Las comillas indican las especies que aún deben transferirse a otros taxa. Ampliado a partir de Huss *et al.* (1999).

Al igual que lo expresado para el orden Chlorococcales, el género *Chlorella*, en sí mismo, también es un grupo polifilético. Los trabajos quimiotaxonómicos (Kessler 1982 y 1984; Kessler y Huss 1992) mostraron que este género es bioquímicamente muy heterogéneo. Las determinaciones de la composición de bases del ADN (Hellmann y Kessler 1974; Kessler 1984; Kessler y Huss 1992) también indicaron que no es un género natural, ya que el contenido de Citosina + Guanina (CG) varía en un rango que cubre casi el espectro completo de %CG encontrado para todos los eucariotas (desde 43 hasta 78% molar; Huss *et al.* 1999). Asimismo, los estudios de hibridación de ADN (Kerfin y Kessler 1978; Huss *et al.* 1989) revelaron la heterogeneidad del género *Chlorella*, detectando que éste comprende al menos tres grupos de especies.

Ikeda y Takeda (1995), apoyando los análisis de hibridación, secuenciación y química de la pared celular, indicaron que la ultraestructura del pirenoide es un carácter especie-específico y que el género *Chlorella* no es monofilético sino polifilético.

Por otro lado, para revelar relaciones entre todas las especies de *Chlorella* y para determinar su posición filogenética dentro de las Chlorophyta, son especialmente útiles los análisis comparativos de secuencias de genes conservados como los genes nucleares y cloroplastídicos del 18S y 16S rARN (Burja *et al.* 2001; Ustinova *et al.* 2001). Desde la publicación del primer árbol, basado en la secuenciación de estos genes, que incluyó especies de *Chlorella* (Huss y Sogin 1990), han estado disponibles numerosas secuencias de diferentes taxa de Chlorophyta, permitiendo la observación de la heterogeneidad de esta alga en un contexto filogenético mucho más amplio (Huss *et al.* 1999; Ueno *et al.* 2003). Sobre la base del análisis de secuencias que codifican para el rARN, como se mencionó anteriormente, Friedl (1995) estableció por primera vez la nueva clase Trebouxiophyceae como un grupo hermano de la clase Chlorophyceae. Las especies de *Chlorella* se distribuyen entre ambas clases. La especie tipo, *C. vulgaris*, y los taxa más estrechamente relacionados: *C. lobophora*, *C. sorokiniana* y *C. kessleri*, pertenecen a Trebouxiophyceae (Friedl 1997; Yamamoto *et al.* 2003) (Figura 2). De acuerdo con lo propuesto por Huss *et al.* (1999), este conjunto de especies conformaría el “verdadero” género *Chlorella* (*Chlorella sensu stricto*).

Sobre la base de los antecedentes planteados, se estableció como tarea, en la primera etapa de este trabajo, estudiar los caracteres morfológicos, ultraestructurales y quimiotaxonómicos de la cepa de *Chlorella* aislada de la Laguna Verde (Copahue, Neuquén), con el objetivo de

lograr su correcta determinación taxonómica. Dada la problemática planteada más arriba, la atribución de una cepa de este género a una especie determinada, es un proceso que requiere la evaluación de un conjunto de caracteres adicionales a los caracteres morfológicos tradicionales. Por ello, los estudios realizados y presentados en este capítulo, abarcaron tanto el análisis de las características morfológicas y ultraestructurales de la especie, como el análisis de algunos de los caracteres bioquímicos y fisiológicos que poseen valor quimiotaxonómico.

La cepa estudiada, fue hallada y aislada durante un relevamiento de distintos cuerpos de agua termales de la provincia del Neuquén. Durante el mismo, se destacaba el color verde intenso que presentaban las aguas de la Laguna Verde (Complejo Termal Copahue). El análisis de dichas aguas y los estudios taxonómicos desarrollados, revelaron que el organismo responsable de esa coloración correspondía a *Chlorella kessleri* Fott et Nováková (1969) y su hallazgo constituyó una cita nueva para la Argentina y el segundo registro de la especie, a nivel mundial, en un ambiente natural.

I. 2. MATERIALES Y MÉTODOS

I. 2. 1. *Características de la zona de muestreo*

Las Termas de Copahue se encuentran ubicadas al pie del volcán homónimo, a los 37° de latitud sur y a los 71° de longitud oeste de la provincia del Neuquén (Argentina), cerca del límite con Chile y a 2000 m sobre el nivel del mar (Figura 3). Están conformadas por distintas estaciones termales cuyas aguas se utilizan con fines terapéuticos. La Laguna Verde se origina por la acumulación de aguas superficiales sobre manifestaciones termales (fumarolas) que le otorgan su temperatura y mineralización. Sus aguas son sulfatadas cálcicas (ácido sulfúrico libre), sulfurosas, sulfhídricas, silicatadas, ligeramente ferruginosas y aluminicas (Anón. 1976). El pH de las mismas, varía entre 2,5 y 3 y su temperatura oscila entre 22 y 30°C, pudiendo alcanzar hasta 35°C. Todo ello registrado durante la campaña con un sensor de campo Hanna HI 1295.

I. 2. 2. *Trabajo de muestreo*

Los muestreos se llevaron a cabo en enero de 1991 en la Laguna Verde de la estación termal Copahue (Neuquén, Argentina). Las muestras se tomaron por triplicado en forma directa y por filtración a través de una red de fitoplancton de 16 μm de poro, se conservaron refrigeradas y se transportaron a los laboratorios de Ficología, donde se procedió al aislamiento de distintas cepas.

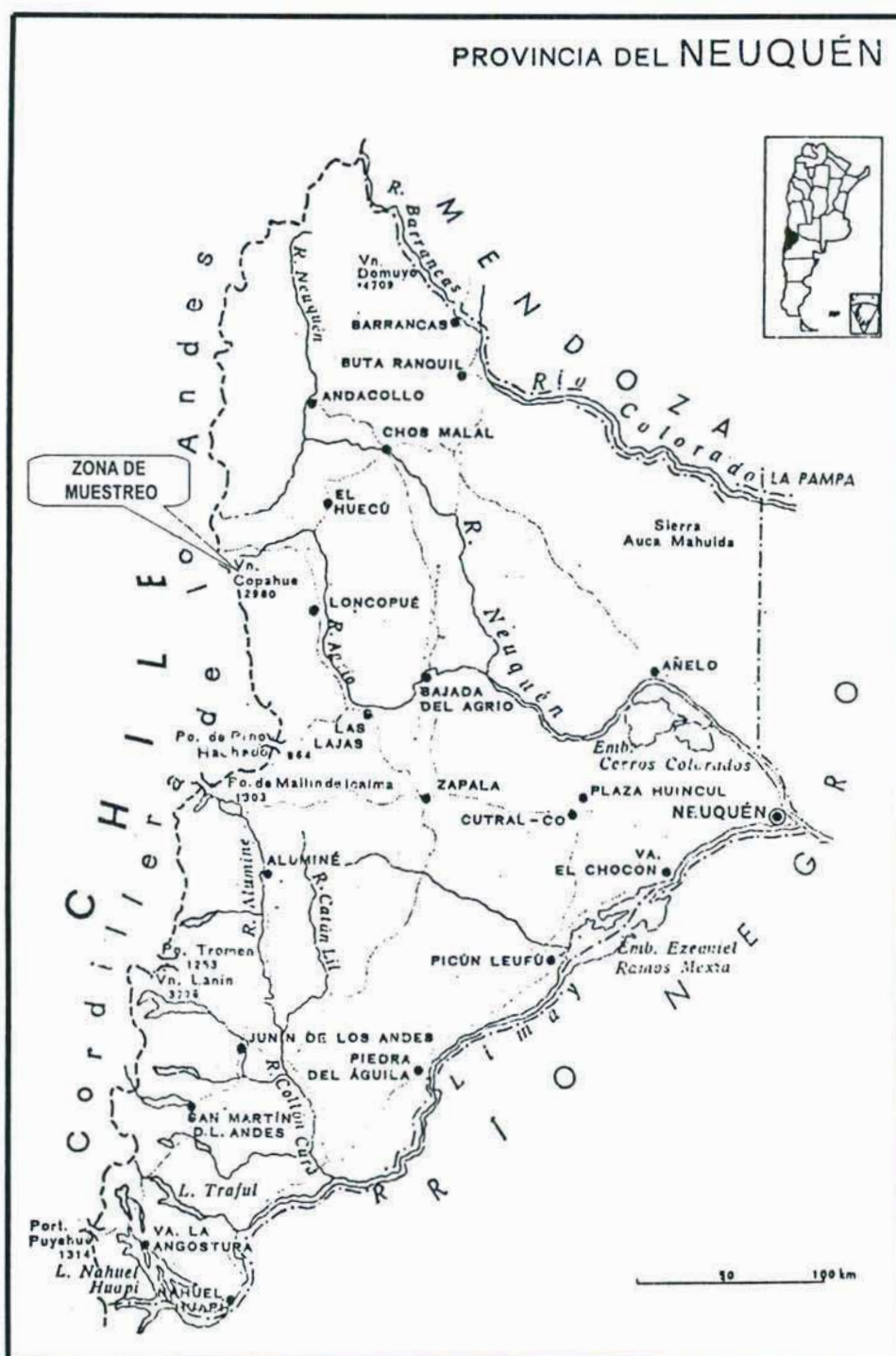


Figura 3. Ubicación geográfica de la zona de muestreo

I. 2. 3. Medios de cultivo

A continuación se detalla la composición de los medios de cultivo utilizados:

BBM: Bold's Basal Medium, modificado por Bischoff y Bold (1963). Este medio fue utilizado en forma agarizada en los procedimientos de aislamiento, purificación y mantenimiento de la cepa, y en forma líquida para los estudios bioquímicos y fisiológicos.

Soluciones de macro y micronutrientes:

1) NaNO_3	25 g/l agua bidestilada
2) KH_2PO_4	17,5 g/l agua bidestilada
3) K_2HPO_4	7,5 g/l agua bidestilada
4) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,5 g/l agua bidestilada
5) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,5 g/l agua bidestilada
6) NaCl	2,5 g/l agua bidestilada

I) Solución de EDTA:

EDTA	50 g
KOH	31 g
Agua bidestilada	c. s. p. 1 l

I) Solución de Fe:

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4,98 g
Agua bidestilada acidificada*	c. s. p. 1 l
*1 ml de H_2SO_4 concentrado en 999 ml de agua bidestilada	

III) Solución de Boro:

H_3BO_3	11,42 g
Agua bidestilada	1 l

IV) Solución de Micronutrientes:

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,82 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,44 g
MoO_3	0,71 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,57 g
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,49 g
agua bidestilada acidificada	c. s. p. 1 l

Medio de cultivo:

Soluciones I a 6	10 ml
Soluciones I a IV	1 ml
Agua bidestilada	c. s. p. 1 l

Se verificó que el pH del medio fuera 5,5 (de no ser así, se ajustó con solución de KOH).

BBM-N: Bold's Basal Medium sin NaNO_3 . Este medio se utilizó en los estudios de liquefacción de gelatina.

0,5BBM: Bold's Basal Medium con la mitad de la concentración original de nitrógeno (preparado con 5ml de solución stock de NaNO_3 / l de medio de cultivo). Este medio se utilizó en forma líquida o solidificado con 1,5 % (p/v) de agar-agar para los estudios de producción de carotenoides secundarios.

0,01BBM: Bold's Basal Medium con una concentración de nitrógeno 100 veces menor que el original (preparado con 0,1ml de solución stock de NaNO_3 / l de medio de cultivo). Este medio se utilizó en forma líquida o solidificado con 1,5 % (p/v) de agar-agar para los estudios de producción de carotenoides secundarios.

BBM almidón: Bold's Basal Medium agarizado enriquecido con 0,1 % (p/v) de almidón de papa. Este medio se utilizó para los estudios de hidrólisis de almidón.

BBM glucosa: medio BBM suplementado con glucosa 0,1% (p/v). Este medio se utilizó para la determinación de actividad hidrogenasa.

UBBM: medio BBM con urea como única fuente de nitrógeno. Este medio se utilizó en forma líquida para las observaciones de la morfología celular.

Solución stock de urea:	urea	54 g
	agua bidestilada c. s. p.	1 l
Medio de cultivo:		
Solución stock de urea		10 ml
Medio BBM-N	c. s. p.	1 l

BBMPL: Medio Proteosa- Extracto de Levadura agarizado. Este medio se utilizó para la purificación a axenicidad de la cepa.

Bacto Proteosa Peptona		1 g
Bacto Extracto de Levadura		1 g
BBM	c. s. p.	1 l
Se solidificó con agar 1,5% (p/v)		

ATS: Medio Bacto Triptona-Soja agarizado. Este medio se utilizó para los controles de axenicidad.

Bacto Triptona-Soja Agar		40 g
Agua bidestilada	c. s. p.	1 l

Saboureaud agarizado: Este medio se utilizó para los controles de axenicidad.

Peptona		10 g
Glucosa		40 g
Agua bidestilada	c. s. p.	1 l
Se solidificó con 1,5-2% (p/v) de agar-agar		

I. 2. 4. *Aislamiento, purificación y cultivo*

Para el aislamiento y obtención de cepas unialgales, se trabajó en condiciones de esterilidad en cámara de flujo laminar. Se hicieron estrías con alícuotas de las muestras vivas en cajas de Petri conteniendo medio BBM agarizado (Bischoff y Bold 1963). De las colonias obtenidas, se seleccionaron las de *Chlorella* y se las repicó en tubos en pico de flauta conteniendo el mismo medio. Los cultivos unialgales fueron purificados hasta un estado axénico según la metodología de Archibald y Bold (1970) (Figura 4). Este procedimiento involucró: 1) obtener una suspensión densa de células en tubos de centrifuga de 12 ml estériles; 2) adicionar una

gota de Tween 80 y dejarlo actuar 20 minutos, sonicando periódicamente en sonicador de baño; 3) centrifugar 15 minutos a 3.000 rpm, descartar el sobrenadante y enjuagar 20 veces con agua destilada estéril (suspensión, sonicado, centrifugación a 3.000 rpm y descarte del sobrenadante); 4) pulverizar la suspensión de células en cajas de Petri conteniendo medio BBMPL; 5) incubar las cajas de Petri sembradas a temperatura ambiente y bajo luz continua y observarlas periódicamente. A partir de los 5 días pudieron apreciarse colonias algales limpias (verde translúcido), colonias algales con bacterias (verde blancuzco u opaco) y colonias bacterianas. Las colonias visiblemente limpias se transfirieron a tubos con BBMPL. Luego de una semana a 10 días, las colonias visiblemente axénicas se transfirieron a tubos en pico de flauta conteniendo BBM. La cepa axénica se mantiene como “cultivos stock”, por repiques sucesivos en ese medio, a temperatura ambiente y bajo luz continua, en la Colección de Cultivos de los Laboratorios de Ficología y Cultivo experimental de Microalgas del Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (cepa número: BAFC CA10). La axenicidad de estos cultivos, es corroborada periódicamente por inoculación en medio ATS y medio Saboureaud, verificando la ausencia de crecimiento bacteriano o fúngico entre las 24 h y los 10 días.

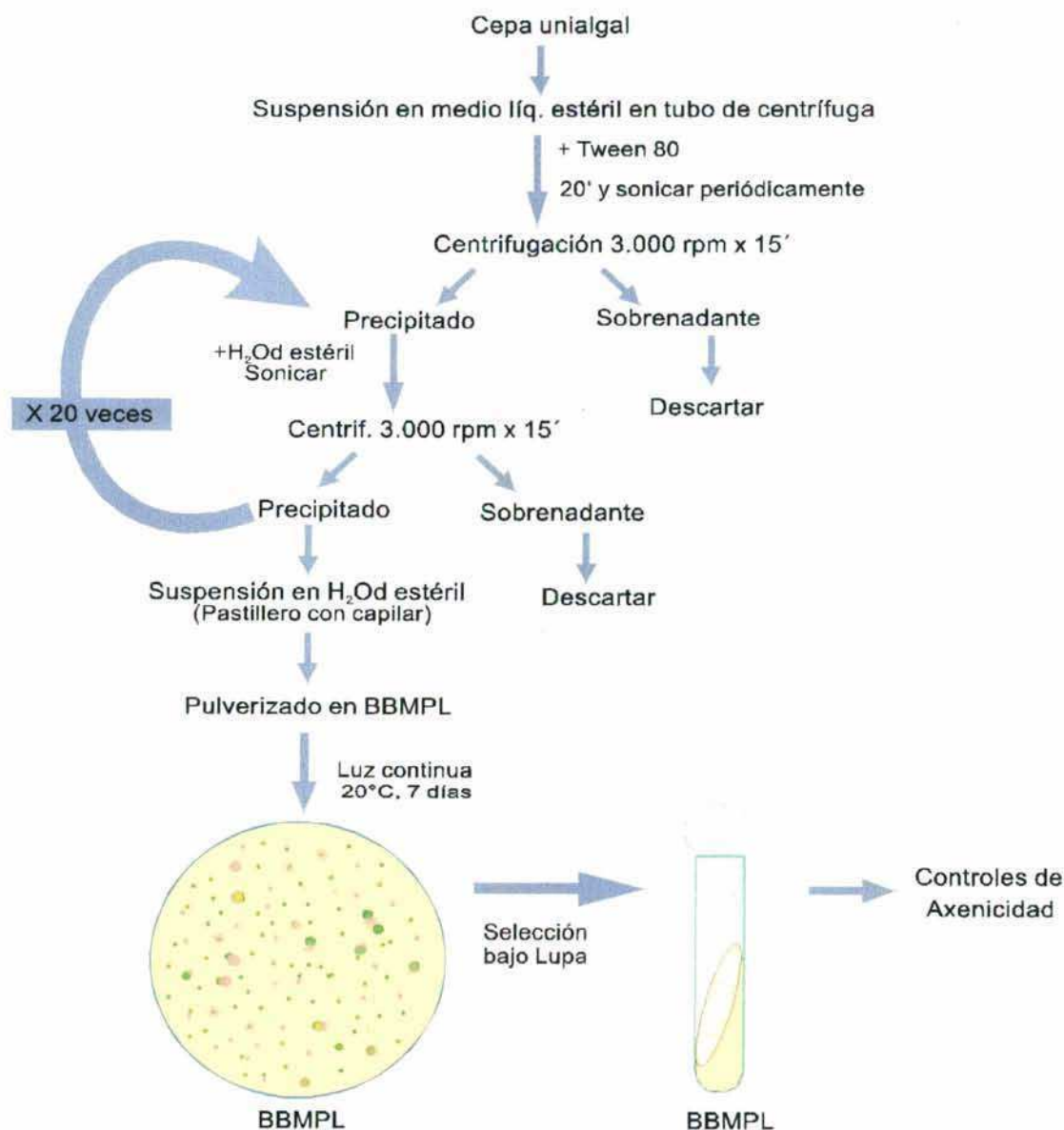


Figura 4. Purificación a axenicidad de la cepa de *Chlorella kessleri* de la Laguna Verde (Copahue, Neuquén)

1. 2. 5. Consideraciones generales

Todo el material de vidrio y los medios de cultivo utilizados durante los estudios, fueron esterilizados por autoclavado a 15 lbs. durante 20 minutos. Los cultivos se mantuvieron a $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y luz continua emitida por tubos fluorescentes proveyendo una iluminación de $80 \mu\text{mol fotones. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$. De aquí en más, se considerarán a estas condiciones como “condiciones estándares”. Para los estudios bioquímicos y fisiológicos que se realizaron en medio líquido, previamente se preparó un inóculo sembrando una masa de células, proveniente de un cultivo stock axénico, en 100 ml de BBM y se dejó crecer durante 2 semanas en un agitador orbital (210 rpm) bajo condiciones estándares.

I. 2. 6. Estudios morfológicos

La morfología de *C. kessleri* se analizó a partir de las muestras naturales y de cultivos axénicos en medio BBM (líquido o agarizado) (Fott y Nováková 1969). También se analizaron cultivos en medio UBBM, ya que las células que crecen en dicho medio almacenan muy poco almidón y ello facilita la apreciación de la morfología del plasto (Archibald y Bold 1970). Las observaciones y dibujos se realizaron utilizando un microscopio Wild M-20 con tubo de dibujo. En todos los casos, se trabajó sobre material vivo, y adicionalmente se realizaron pruebas histoquímicas para detectar e identificar la presencia de componentes de diferente naturaleza en la pared celular y en el citoplasma, practicando tinciones con los siguientes colorantes:

- a) **Lugol:** preparado y aplicado de acuerdo con D'Ambrogio de Argüeso (1986). Especificidad: amilosa y amilopectina.
- b) **Azul de toluidina:** preparado y aplicado de acuerdo con Gahan (1984). Especificidad: colorante metacromático que tiñe de azul los componentes básicos, de rojo o púrpura los componentes ácidos como polisacáridos sulfatados y carboxilados (pectinas y hemicelulosa de pared celular) y de verde o azul verdoso los componentes hidrofóbicos como lignina y fenoles.
- c) **Azul de metileno:** preparado y aplicado de acuerdo con Gahan (1984). Especificidad: ídem azul de toluidina.
- d) **Rojo de rutenio:** preparado y aplicado de acuerdo con D'Ambrogio de Argüeso (1986) y Krishnamurthy (1999). Especificidad: las pectinas no esterificadas de pared celular (polisacáridos con grupos aniónicos) toman una coloración roja.
- e) **Cloruro de zinc iodado:** preparado y aplicado de acuerdo con Krishnamurthy (1999). Especificidad: al tratar previamente las células con 50 % KOH en caliente para convertir la quitina en quitosan, este último se tiñe de color violeta.

También se realizaron observaciones en microscopio de epifluorescencia, con y sin el agregado de los siguientes fluorocromos:

- f) **Naranja de acridina:** preparado y aplicado de acuerdo con D'Ambrogio de Argüeso (1986) y Oparka y Read (1994). Especificidad: fluorocromo metacromático. Los polisacáridos ácidos dan fluorescencia naranja-roja, la calosa da fluorescencia verde-celeste y las sustancias hidrofóbicas como lignina y suberina dan fluorescencia verde.
- g) **Berberina:** preparada y aplicada de acuerdo con D'Ambrogio de Argüeso (1986) y Pearse (1986). Especificidad: las paredes celulares con componentes fenólicos, como las paredes lignificadas, dan fluorescencia amarilla.
- h) **Quinacrina:** aplicada y preparada de acuerdo con Domozych *et al.* (1993). Especificidad: marcador aniónico que evidencia la presencia de vacuolas por fluorescencia amarilla.
- i) **Primulina:** aplicada y preparada de acuerdo con Puel *et al.* (1987). Especificidad: esporopolenina y algaenanos.
- j) **Calcofluor:** preparado y aplicado de acuerdo con Maeda y Ishida (1967). Especificidad: polisacáridos fibrilares con enlaces de tipo β (1 \rightarrow 4) y β (1 \rightarrow 3) como celulosa y manananos fibrilares.

Las células tratadas con los distintos colorantes fueron observadas en un microscopio Karl Zeiss Axioplan equipado con epifluorescencia y cámara fotográfica (Depto. Biodiversidad y Biología Experimental, FCE y N, UBA). La determinación taxonómica, sobre la base de los caracteres morfológicos, se realizó siguiendo el criterio de Fott y Nováková (1969) y Komárek y Fott (1983).

I. 2. 7. Estudios ultraestructurales

La ultraestructura celular de *Chlorella kessleri* se analizó a partir de material de cultivo crecido en medio BBM líquido. Las células se cosecharon por centrifugación a 3.000 rpm y se fijaron en una solución al 2% (p/v) de glutaraldehído-paraformaldehído en BBM (filtrado a través de membrana millipore) por 24 horas a 5°C. El material fijado se postfijó en OsO₄ 1% durante 1 hora a temperatura ambiente y se deshidrató por pasajes a través de una serie de acetona del 10% al 100%. Ese material fue embebido en resina Spurr de baja viscosidad. Los cortes se realizaron con una cuchilla de diamante Diamond 2.1 y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo (Reynolds 1963) o rojo de rutenio seguido por coloración de

Reynolds. Las observaciones se llevaron a cabo con un microscopio electrónico de transmisión Jeol 1200 EXIIME (INTA, Castelar).

1. 2. 8. Estudios quimiotaxonómicos

Se determinaron las siguientes características bioquímicas y fisiológicas:

a) **Digestión de almidón:** la capacidad de hidrolizar almidón fue ensayada de acuerdo a Archibald y Bold (1970) y Kessler (1978). Se realizó una estría de células provenientes de cultivos stock axénicos en cajas de Petri conteniendo medio BBM almidón. Las cajas de Petri se incubaron por 3 semanas bajo condiciones estándares, y luego se revelaron con una solución de I_2KI (5 % I + 10 % KI en agua destilada). El ensayo se repitió tres veces por duplicado. Un color azul intenso, indica la presencia de almidón y un color pardo claro o blanco, la ausencia del mismo (área en la que el almidón fue hidrolizado por producción de enzimas amilolíticas extracelulares).

b) **Hidrólisis de gelatina:** fue ensayada de acuerdo a la técnica de Kessler y Czygan (1965) y Mac Faddin (1980). Se disolvieron 100 gr de gelatina (Difco) en 400 ml de agua bidestilada, y se dializaron contra agua bidestilada durante 24 h, cambiando el agua cada 6 h para remover el nitrógeno soluble. A 531 ml de agua bidestilada, se le agregaron las cantidades de soluciones stock como para preparar 1 l de medio BBM-N. En este medio resultante, se disolvió la gelatina dializada y se fraccionó en tubos de ensayo para ser esterilizados. Estos tubos fueron inoculados en profundidad, mediante pipetas estériles, con una suspensión de células obtenida por el agregado de agua bidestilada estéril en cultivos stock axénicos en BBM pico de flauta. El ensayo se repitió en dos oportunidades, por duplicado, con tubos sin inocular como controles. Todos los tubos se incubaron durante 3 semanas bajo condiciones estándares. Al final de ese período, se colocaron cuidadosamente (no deben agitarse los tubos para evitar falsos negativos) en heladera o baño de hielo por 2 h. Luego se determinó la presencia de liquefacción de gelatina por comparación con los tubos controles.

c) **Producción de carotenoides secundarios:** fue ensayada según la técnica cualitativa de Kessler y Soeder (1962), basándose en el cambio de coloración que se observa cuando se acumulan carotenoides secundarios en cultivos algales bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno (Kessler 1976; Hanagata y Dubinsky 1999). El ensayo se realizó estableciendo cultivos en tubos conteniendo medio mineral con concentraciones decrecientes de nitrógeno,

tanto líquido como agarizado. Las células utilizadas para inocular cada tubo provinieron de un cultivo stock en BBM agarizado; previamente se lavaron en agua destilada estéril para evitar el arrastre de nitrógeno desde el cultivo original hacia los medios deficientes en él. Las células lavadas se inocularon en los siguientes medios: BBM, 0,5BBM y 0,01BBM (Tabla 4). Los cultivos se mantuvieron bajo condiciones estándares. Luego de 4 semanas y luego de 3 meses de crecimiento, se analizó la coloración de los cultivos y la coloración de sus células al microscopio óptico. Un color naranja o pardo indica la producción de carotenoides secundarios. El ensayo fue realizado en tres oportunidades por triplicado y utilizando como control positivo una cepa de *Trebouxia* sp. productora de carotenoides secundarios y perteneciente a la misma clase algal que *C. kessleri* (Trebouxiophyceae).

Tabla 4. Contenido de nitrógeno de los medios de cultivo utilizados en el estudio de producción de carotenoides secundarios.

Medio	Contenido de Nitrógeno (mmol/ l)
BBM	2,9
0,5 BBM	1,45
0,01 BBM	0,029

d) **Actividad hidrogenasa:** La existencia de actividad hidrogenasa fue estudiada, en células intactas, de acuerdo a Kessler y Maifarth (1960) y Ward (1970). Para ello, se utilizó el aparato de Warburg que mide cambios en la presión de gases (Figura 5).

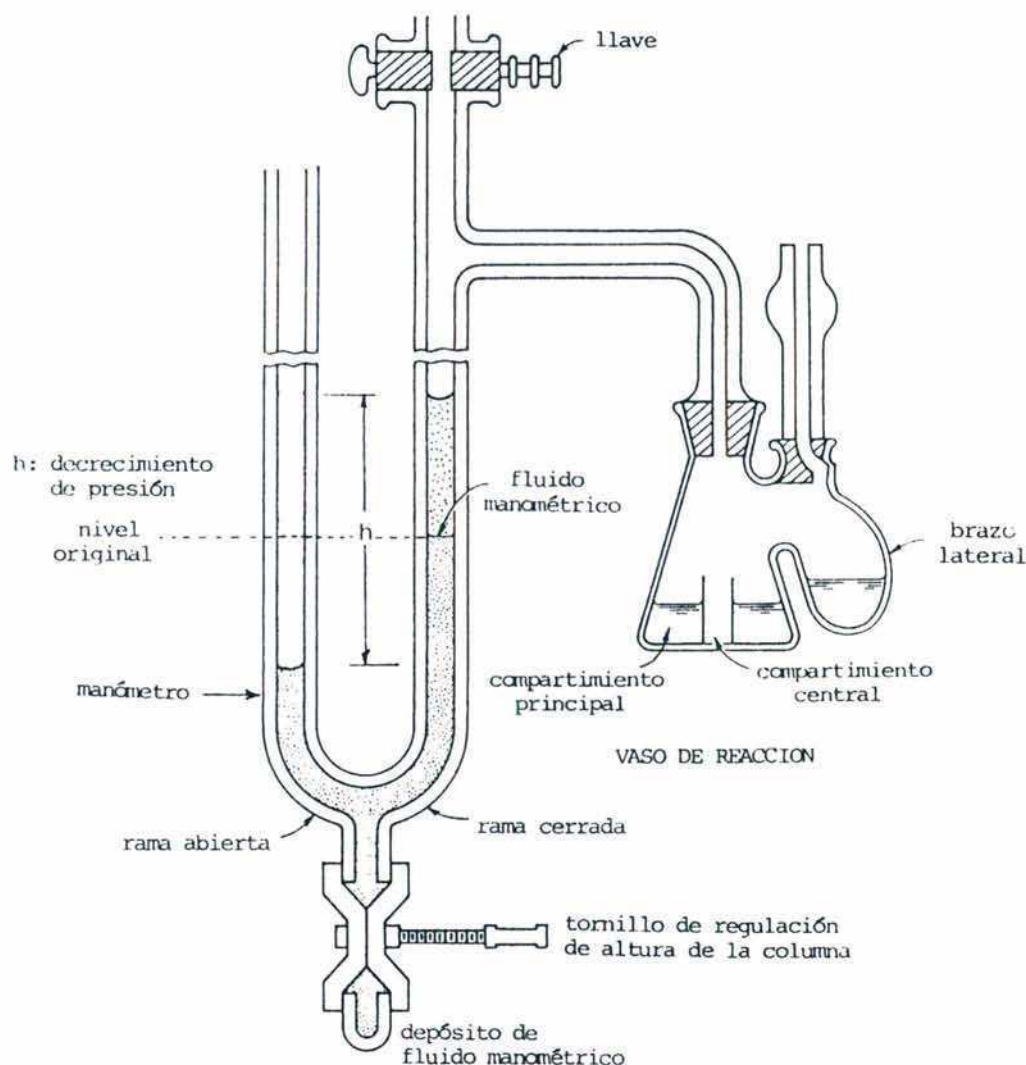


Figura 5. Aparato de Warburg para medir cambios en la presión de gases.

Se establecieron cultivos axénicos de *C. kessleri* en erlenmeyers conteniendo 200 ml de medio BBM glucosa y se mantuvieron, en condiciones estándares, bajo agitación continua en agitador orbital (210 rpm). Cada 5 días, se transfirieron 50 ml de cultivo a 200 ml de medio fresco (para asegurar la sincronización de las células en el cultivo). Luego de la cuarta transferencia y de que ésta creciera por 5 días, se cosecharon las células por centrifugación a 1.500 rpm durante 10 minutos y se lavaron 4 veces en 20 ml de buffer fosfato pH 4,5. Luego de esto, se centrifugó a 3.000 rpm por 10 minutos, de manera de obtener un precipitado final de 0,5 ml. Para lograr una suspensión homogénea, a dicho precipitado se le agregaron 18 ml de buffer fosfato pH 4,5. Se colocaron 1,8 ml de esa suspensión algal en el compartimiento principal de cada vaso de reacción de Warburg (ver Figura 5). Se agregó el aceptor de

hidrógeno en el brazo lateral de uno de esos vasos (0,4 ml de NaNO_2 0,05 M) y se colocaron unos cristales de pirogalol en el compartimiento central. Se aplicó una corriente de nitrógeno gaseoso, durante 10 minutos, en cada vaso de reacción y en todo el sistema. Mientras fluía nitrógeno, se agregaron 0,3 ml de solución de KOH 10 % (p/v) al compartimiento central que contenía pirogalol, para formar una solución que absorbe CO_2 y O_2 (la solución alcalina de pirogalol se colorea en contacto con el aire y debe permanecer incolora durante todo el ensayo para indicar que no ha ingresado CO_2 u O_2 al sistema). Se continuó aplicando la corriente de nitrógeno gaseoso unos minutos más, luego se aplicó una corriente de hidrógeno durante 3 minutos y se cerró el sistema. Los manómetros se agitaron en un baño termostático a 25°C , de manera de equilibrar la temperatura en el sistema. Luego se inclinó el vaso de reacción, para volcar el NaNO_2 sobre la suspensión algal, y se tomó ese momento como tiempo cero. Se incubó durante 48 h en oscuridad, agitando continuamente en el baño a 25°C y realizando lecturas periódicas en el manómetro (cada 6 h). Si existe actividad hidrogenasa, habrá consumo de hidrógeno, lo cual se refleja en un ascenso de líquido en la columna derecha del manómetro. La experiencia fue realizada por duplicado, y con un testigo sin aceptor de hidrógeno (sin NaNO_2).

e) **Tolerancia a la sal:** La tolerancia a la sal fue determinada de acuerdo a Kessler (1974). Se prepararon, por duplicado, erlenmeyers de 250 ml conteniendo 100 ml de medio BBM suplementado con 0%, 1%, 2% y 3% (p/v) de NaCl (medio BBM-NaCl). En ellos, se sembró un volumen de inóculo como para obtener una concentración inicial de 3×10^4 células/ml. Todos los cultivos se mantuvieron en agitador orbital (210 rpm), bajo condiciones estándares. Luego de 2 meses, se estimó el crecimiento de cada cultivo mediante recuentos al microscopio óptico con cámara de Neubauer (Booth 1995). Se contaron tantas alícuotas como fuera necesario, de manera que el error resultara menor al 10 %. Con los resultados obtenidos, se graficó el crecimiento relativo $[(\text{N}^\circ \text{ células/ml final} - \text{N}^\circ \text{ células /ml inicial}) / \text{N}^\circ \text{ inicial}] \pm \text{DS}$, en función del % NaCl en el medio de cultivo.

f) **Tolerancia a la acidez:** Para determinar la tolerancia al medio ácido, se prepararon 4 juegos de 6 erlenmeyers conteniendo 100 ml de BBM a pH 2,5 - 3,0 - 3,5 - 4,0 - 4,5 y 5,0. Las mediciones de pH fueron realizadas con un pHmetro PM Altrónix, ajustándolo con una solución de ácido sulfúrico 1N. Los 24 erlenmeyers se sembraron con un volumen de inóculo como para obtener una concentración inicial de 10^5 células/ml y se mantuvieron bajo condiciones estándares. La estimación del crecimiento de los cultivos se realizó, por

duplicado, a los 20 días y a los 3 meses de crecimiento, mediante recuentos en cámara de Neubauer (según especificaciones del punto anterior: tolerancia a la sal). En todos los casos, se corroboró el pH final de los cultivos, el cual prácticamente no presentó variaciones a los 20 días, mientras que la variación a los 3 meses no superó el 10%. Con los resultados obtenidos, se graficó el crecimiento relativo $[(N^{\circ}\text{células/ml final} - N^{\circ}\text{células/ml inicial}) / N^{\circ}\text{ inicial}] \pm \text{DS}$, en función del pH.

I. 2. 9. Estudios de la composición química de la pared celular

Las células provenientes de un cultivo en medio BBM, se cosecharon por centrifugación a 3.000 rpm durante 10 minutos y se sonicaron durante 2 minutos y medio en un homogenizador ultrasónico Cole Parmer CP600 4710. El homogenato obtenido se centrifugó a 5.000 rpm durante 15 minutos, para separar la fracción citosólica de la fracción que contenía las paredes celulares. Esta última fracción se lavó repetidamente con agua destilada, se liofilizó y se sometió a un tratamiento de amilólisis enzimática de acuerdo al protocolo propuesto por Brillouet *et al.* (1988). Para ello, el producto liofilizado se resuspendió en buffer acético-acetato 0,1 M pH 5, agitándolo vigorosamente durante 30 minutos a 100° C. La digestión enzimática se inició con el agregado de 2,4 unidades enzimáticas de α amilasa de cebada (Sigma) en 1 ml de buffer y se incubó durante 15 minutos a 100° C con agitación. Luego se añadieron 5,8 unidades enzimáticas de α amilasa porcina (Sigma) en 1 ml de buffer y se incubó durante 15 minutos a 100° C con agitación. La digestión enzimática se completó con el agregado de 50 unidades enzimáticas de amiloglucosidasa (Sigma), manteniendo la incubación a 60° C por 2 hs. Se centrifugó a 5.000 rpm, y el precipitado se dializó durante 48 h contra agua destilada, a través de membrana de diálisis P-3,5. El producto no dializable (PND) se liofilizó, obteniéndose un rendimiento del 91%, y se determinó su contenido de hidratos de carbono totales y aminoazúcares por los métodos de Dubois *et al.* (1956) y Lane Smith y Gilkerson (1979), respectivamente. El producto PND se sometió a hidrólisis ácida de acuerdo con la metodología de Takeda (1996). Primeramente, se hidrolizó con ácido trifluoroacético (TFA) 2N a 100° C durante 6 h. El hidrolizado se centrifugó, se separó la fracción soluble (HS), y el residuo insoluble resistente al TFA 2N se hidrolizó con HCl 6 N a 110° C durante 18 h (HR).

Para realizar el análisis de monosacáridos constituyentes de la matriz amorfa (matriz no fibrilar) de las paredes celulares, se obtuvieron los acetatos de alditos de la fracción HS, de acuerdo al método de Albersheim *et al.* (1967). Estos derivados se analizaron por

cromatografía gas-líquido (CGL), utilizando una columna capilar (30 m x 0,25 mm) SP2330 (Supelco) y un Cromatógrafo Hewlett-Packard 5890 equipado con un integrador 3392A. Las corridas se hicieron a 220° C, manteniendo el inyector y el detector a 240 y utilizando un flujo de nitrógeno de aproximadamente 1ml/min. Las asignaciones se corroboraron por CGL-EM (cromatógrafo gas-líquido acoplado a un equipo de espectrometría de masa Shimadzu GCMS-QP 1000), obteniendo espectros en un rango entre 40 y 400 amu (unidades de masa), utilizando un potencial de ionización de 70 eV.

Para realizar el análisis de hexosaminas constituyentes de la pared rígida (matriz fibrilar), se siguió el método de desaminación con ácido nitroso (Turner y Cherniak 1981). La fracción HR se llevó a seco, eliminando el ácido. Se le agregó 1 ml de TFA 2N, colocándola, tapada, en un baño de hielo-agua. Se agregaron 150 mg de NaNO_2 , y a la hora se eliminó el ácido nitroso residual, colocando la muestra en un baño a 100° C durante 5 minutos. Se enfrió y se llevó a sequedad. Para la obtención de los aldononitrilos, se sometió la muestra seca al siguiente tratamiento: se le agregó una punta de espátula de hidroxilamina (aproximadamente 10 mg) y se resuspendió en 0,5 ml de piridina. Se llevó a estufa a 75° C por 30 minutos. Luego se agregaron 0,5 ml de anhídrido acético y se llevó nuevamente a estufa a 75° C por 30 minutos. Seguidamente, se extrajo con una mezcla de $\text{Cl}_3\text{CH} : \text{H}_2\text{O}$ (2 : 1, v/v), se descartó la fase acuosa, y la fase clorofórmica se lavó 3 veces con 1 ml de solución saturada de bicarbonato de sodio. Finalmente, se hizo un último lavado con agua destilada y se secó con Na_2SO_4 anhidro. Los aldononitrilos se analizaron por CGL, de acuerdo a lo especificado en el análisis de los constituyentes de la matriz amorfa y corriendo, paralelamente, un estándar de glucosamina.

I. 3. RESULTADOS

De acuerdo con las observaciones morfológicas, ultraestructurales y los estudios quimiotaxonómicos realizados, la cepa aislada de la Laguna Verde del Complejo Termal Copahue (Neuquén, Argentina), corresponde a la especie *Chlorella kessleri* Fott et Nováková (1969).

I. 3. 1. Estudios morfológicos

El sistema de clasificación adoptado, se basa en el sistema filogenético propuesto por Friedl (1997).

División Chlorophyta

Clase Trebouxiphyceae

Orden Chlorellales

Chlorella kessleri Fott et Nováková, Stud. in Phycol., Acad., Prague: 26, Pl 4, 1969 (Figuras 6 y 7)

Sinonimias

Chlorella regularis auct. non (Artari) Olymanns, Shihira et Krauss 1965, p. 27 - 28, fig. 25, 26 (incl. var. *umbricata* Shihira et Krauss 1965, p. 28, 29, fig. 27, 28).

Chlorella vulgaris auct. non Beijerinck, George 1958, p. 9; Koch 1964, p. 412; Starr 1964, p. 1022 (cepa de Pratt); George 1966, p. 23.

Chlorella II sensu Kessler et al. 1963, p. 17-18; Soeder 1963, p. 26, 32. *Chlorella vulgaris* Beijerinck cepa de Winokur N° 211-11g en la CCAP (cultivo tipo).

Chlorella vulgaris Beijerinck cepa de Pratt (1941) N° 398 en la colección de cultivos de Bloomington.

Chlorella vulgaris Beijerinck cepa de Craig y Trelease N° 397 en la colección de cultivos de Bloomington.

Chlorella pyrenoidosa Chick cepa C 1.1.1 en la colección de cultivos de Erlangen.

Descripción

Células adultas esféricas, células jóvenes y autosporas elipsoidales. Pared celular delgada. Cloroplasto laminar, ocupando toda la célula y dejando una pequeña abertura. Pirenoide elipsoidal, rodeado por dos (raramente más) gránulos de almidón en forma de copa. Presencia de pequeñas gotas lipídicas, y vacuolas a veces numerosas. Núcleo levemente excéntrico. Reproducción por medio de 2 - 4 - 8 a 16 autosporas elipsoidales, a veces poliédricas por

compresión. Durante la liberación de las autosporas, la pared de la célula madre se fragmenta dejando restos en forma de escamas, que mantienen unidas las autosporas por un corto tiempo.

Dimensiones: células 2,5 - 8,9 μm – (10 μm) diám.; autosporas 2,5 - 5 μm diám., esporangios 4,5 - 11,4 μm .

Distribución: Registrada como aerofítica en Rusia y en colecciones de cultivo sin especificación certera de su origen, ya que todas las cepas habían sido originalmente identificadas como *C. vulgaris* (Komárek y Fott 1983). Este es el primer registro para Argentina.

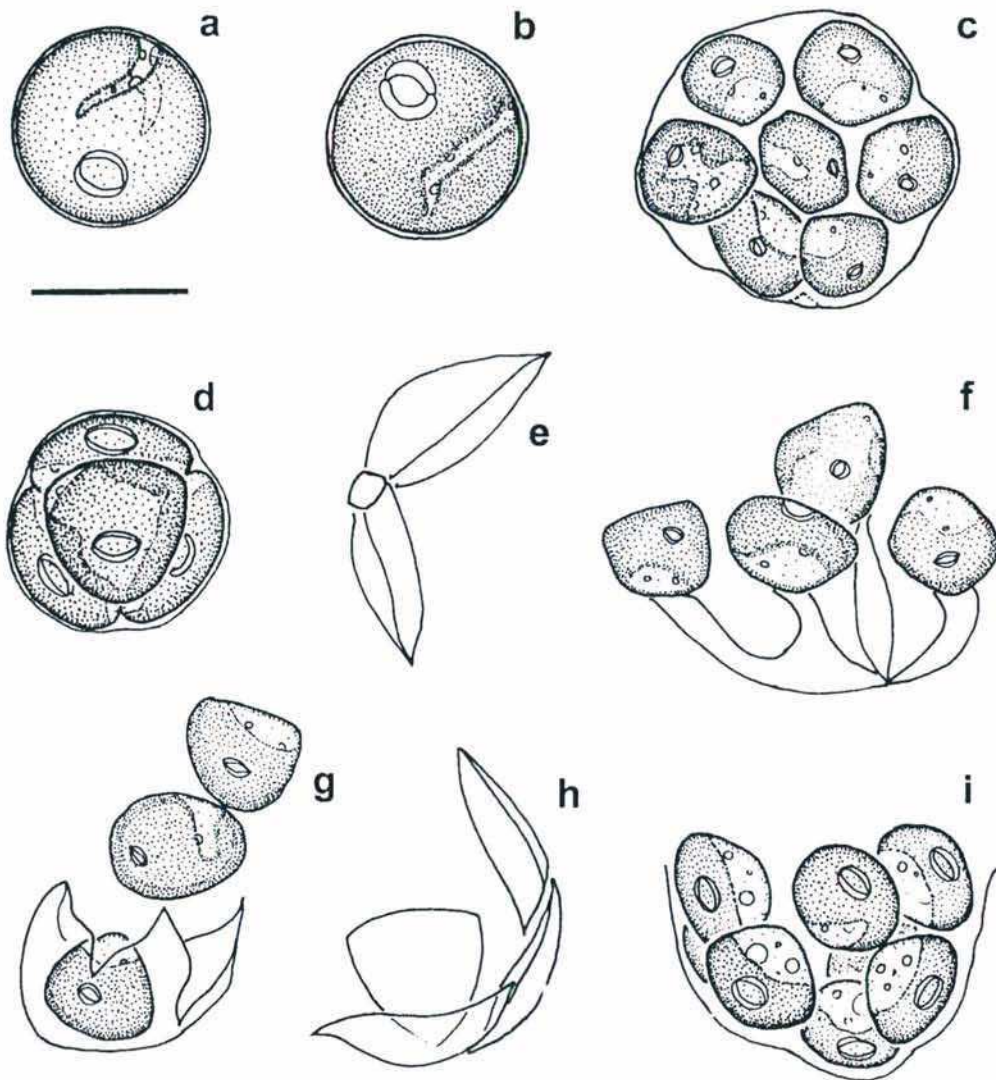


Figura 6. Distintos estadios del ciclo de vida de *Chlorella kessleri*. a - b: células adultas; c: esporangio de ocho autosporas; d: esporangio de cuatro autosporas; e: restos de la pared celular madre; f: cuatro autosporas recién liberadas, todavía unidas a la pared celular madre; g: liberación de autosporas por rotura de la pared celular madre; h: restos de la pared celular madre; i: liberación de ocho autosporas, por rotura de la pared celular madre. La escala equivale a 5 μm y es válida para todas las figuras.

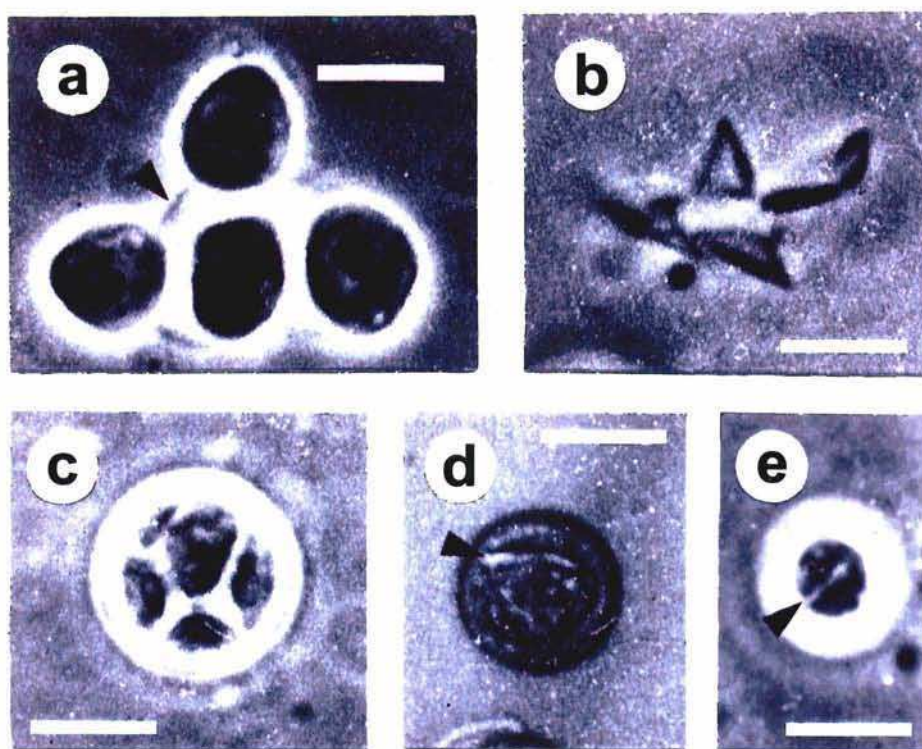


Figura 7. *Chlorella kessleri* creciendo en medio UBBM líquido. a: cuatro autosporas adheridas a restos de la pared celular madre (flecha); b: restos de pared celular madre; c: vista superficial de un esporangio mostrando autosporas en formación; d: vista superficial de una célula adulta, en la que puede apreciarse la estrecha abertura que deja el cloroplasto (flecha); e: idem d, en otra célula. a – c, e: observaciones con contraste de fase. Escalas = 5 µm.

Resultados histoquímicos

Los resultados de las pruebas histoquímicas realizadas, se resumen en la Tabla 5 y en las Figuras 8 a 10.

Tabla 5. Coloraciones histoquímicas aplicadas a células vivas de *Chlorella kessleri*, cultivadas en medio BBM.

Colorante	Especificidad	Resultado	Localización
Lugol	Amilosa y amilopectina. Coloración azul o parda oscura	+	Pirenoide
Azul de Toluidina	Metacromático: Polisacáridos sulfatados y carboxilados (pectinas o hemicelulosa de pared celular): rojo o púrpura. Componentes hidrofóbicos: verde o azul verdoso	+	Paredes y vacuolas
Azul de Metileno	Ídem Azul de Toluidina	+	Paredes
Cloruro de zinc iodado	Quitina (luego de tratamiento con 50% KOH en caliente). Coloración violeta	+	Paredes
Rojo de Rutenio	Pectinas no esterificadas de pared celular. Polisacáridos con grupos aniónicos.	—	
Naranja de acridina	Metacromático. Polisacáridos ácidos: fluorescencia naranja - roja. Calosa: fluorescencia verde-celeste. Lignina y suberina: fluorescencia verde	+	Paredes
Berberina	Paredes con polifenoles. Fluorescencia amarilla	+	Paredes
Quinacrina	Colorante aniónico. Marca la presencia de vacuolas. Fluorescencia amarillo-verde	+	En citoplasma
Primulina	Esporopolenina y algaenano de paredes celulares	—	
Calcofluor	Celulosa y mananos fibrilares de paredes celulares	—	

- Las tinciones con lugol evidenciaron dos calotas de almidón rodeando un pirenoide central a levemente excéntrico (Figura 8 d - f).
- La pared celular de la cepa en estudio tomó una coloración púrpura-violácea en presencia de azul de toluidina, indicando la presencia de polisacáridos ácidos (Figura 9 a - d).

- c) Las tinciones realizadas con azul de metileno, permitieron una mejor observación de los restos en forma de escamas, que dejan las paredes de los esporangios luego de la liberación de sus autosporas (Figura 9 a - b). En este caso, también se observó una coloración púrpura-violácea en dichas paredes.
- d) La tinción con cloruro de zinc iodado resultó positiva. Luego de un tratamiento previo con KOH 50% en caliente, la pared de las células tratadas con este colorante tomó una coloración violeta intensa, indicando la presencia de quitosan, producto de la oxidación de la quitina con KOH 5%.
- e) La tinción con rojo de rutenio resultó negativa (Figura 8 a - c). Este colorante reacciona con los grupos aniónicos (por ej. carboxilos de polisacáridos ácidos) dando una coloración roja, pero su capacidad de reacción depende de la existencia de una alta densidad de cargas negativas (Luft 1971; Pearse 1986).
- f) La presencia de polisacáridos ácidos en la pared celular de esta cepa de *C. kessleri*, detectada por la aplicación de azul de toluidina, también se puso de manifiesto con naranja de acridina. Con este último colorante, las células tratadas presentaron fluorescencia naranja-amarillenta en sus paredes (Figura 10 b - c).
- g) Con la aplicación de berberina, también se observó una marcada fluorescencia amarilla en las paredes celulares, lo cual podría indicar la presencia de algún polímero hidrofóbico asociado a ellas (Figura 10 d - f).
- h) La tinción con quinacrina, evidenció la presencia de vacuolas en el citoplasma. El contenido de las mismas, sería presumiblemente ácido (Figura 10 g), ya que las vacuolas también tomaron una coloración roja en presencia de azul de toluidina (Figura 9 e - f).
- i) La falta de fluorescencia en las paredes celulares, al realizar las tinciones con primulina y calcofluor, indicó la ausencia de celulosa y algaenano, respectivamente.

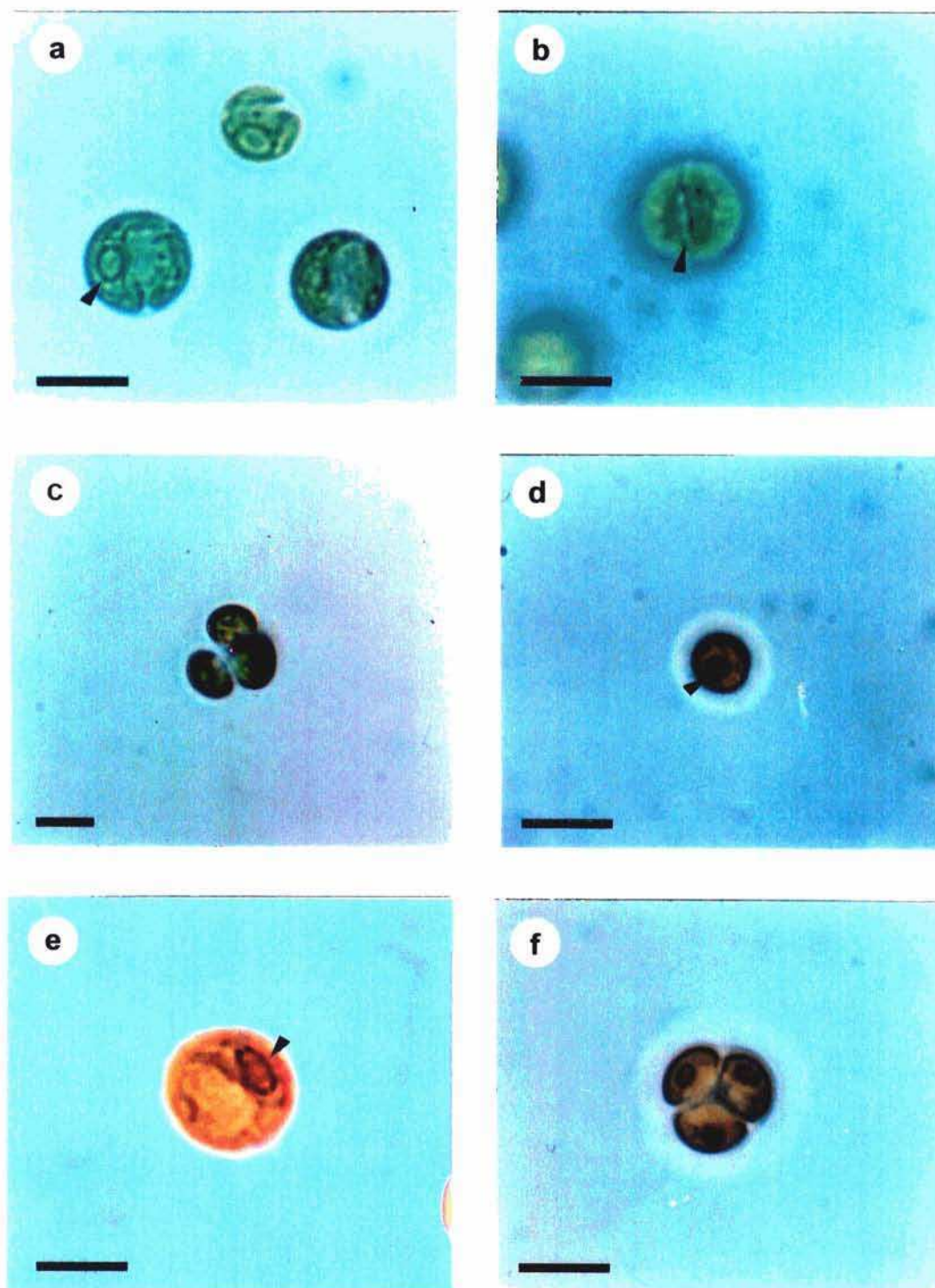


Figura 8. Coloraciones histoquímicas de células de *Chlorella kessleri* cultivadas en BBM líquido. a – c: tinción con rojo de rutenio; a: conjunto de células adultas mostrando la ausencia de coloración en sus paredes, el cloroplasto parietal y el pirenoide (flecha); b: vista superficial de una célula adulta mostrando la pequeña hendidura que deja el cloroplasto (flecha); c: esporangio de cuatro autosporas; d – f: tinción con lugol. d: célula joven mostrando el pirenoide rodeado por dos calotas de almidón (flecha); e: célula adulta mostrando el pirenoide rodeado por dos calotas de almidón (flecha); f: esporangio de cuatro autosporas. Escalas = 5 µm.

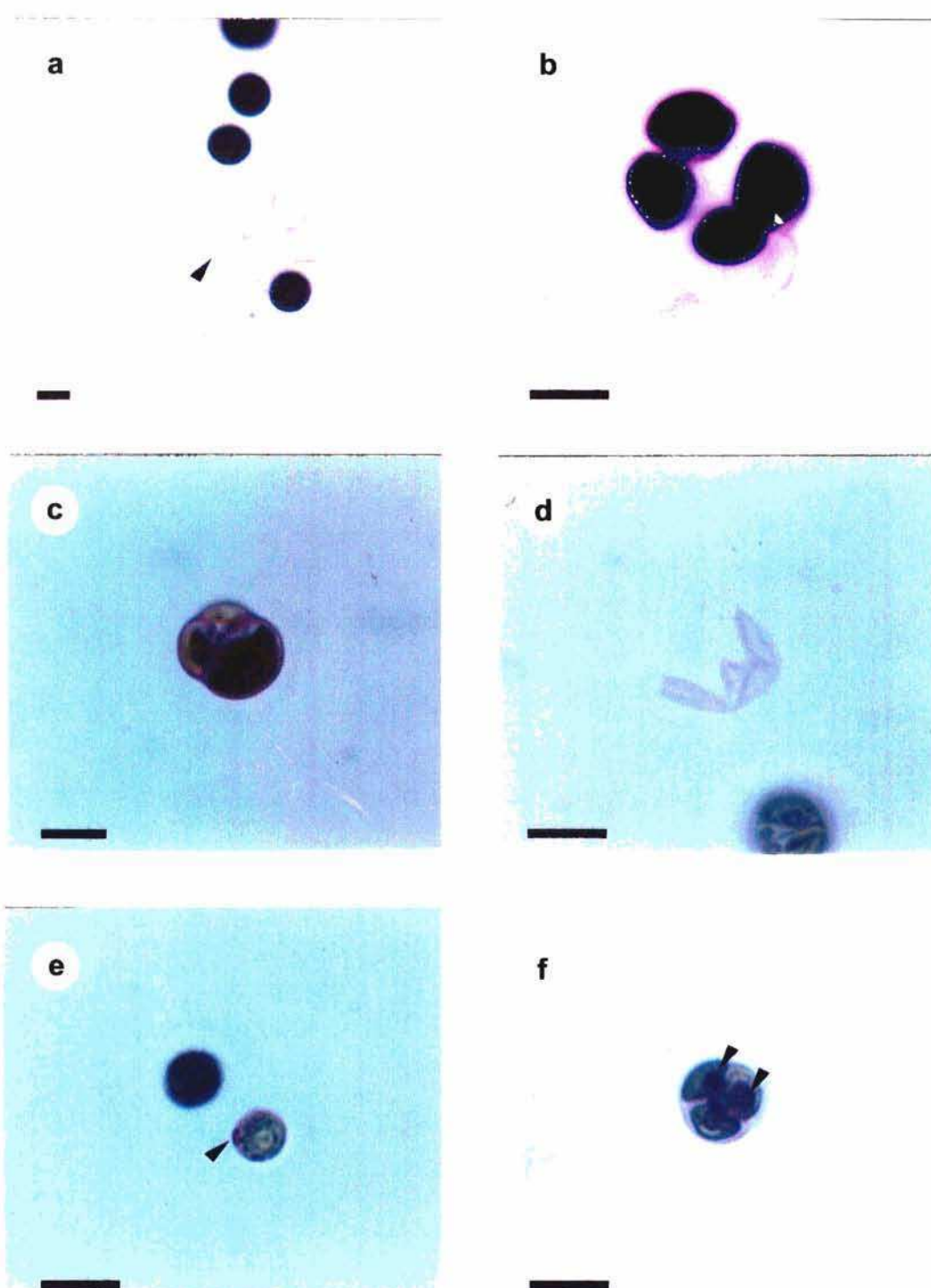


Figura 9. Coloraciones histoquímicas de células de *Chlorella kessleri* cultivadas en BBM líquido. a – b: tinción con azul de metileno; a: restos de paredes celulares madres en forma de escamas (flecha); b: liberación de cuatro autosporas por rotura de la pared celular del esporangio. c – f: tinción con azul de toluidina; c: esporangio mostrando sus paredes celulares y las de las autosporas teñidas de color púrpura-violáceo; d: restos de pared celular madre teñidos de color púrpura-violáceo; e: células jóvenes mostrando, en su citoplasma, vacuolas teñidas de rojizo (flecha); f: esporangio de cuatro autosporas mostrando vacuolas rojizas en el citoplasma de las autosporas (flechas). Escalas = 5 μ m.

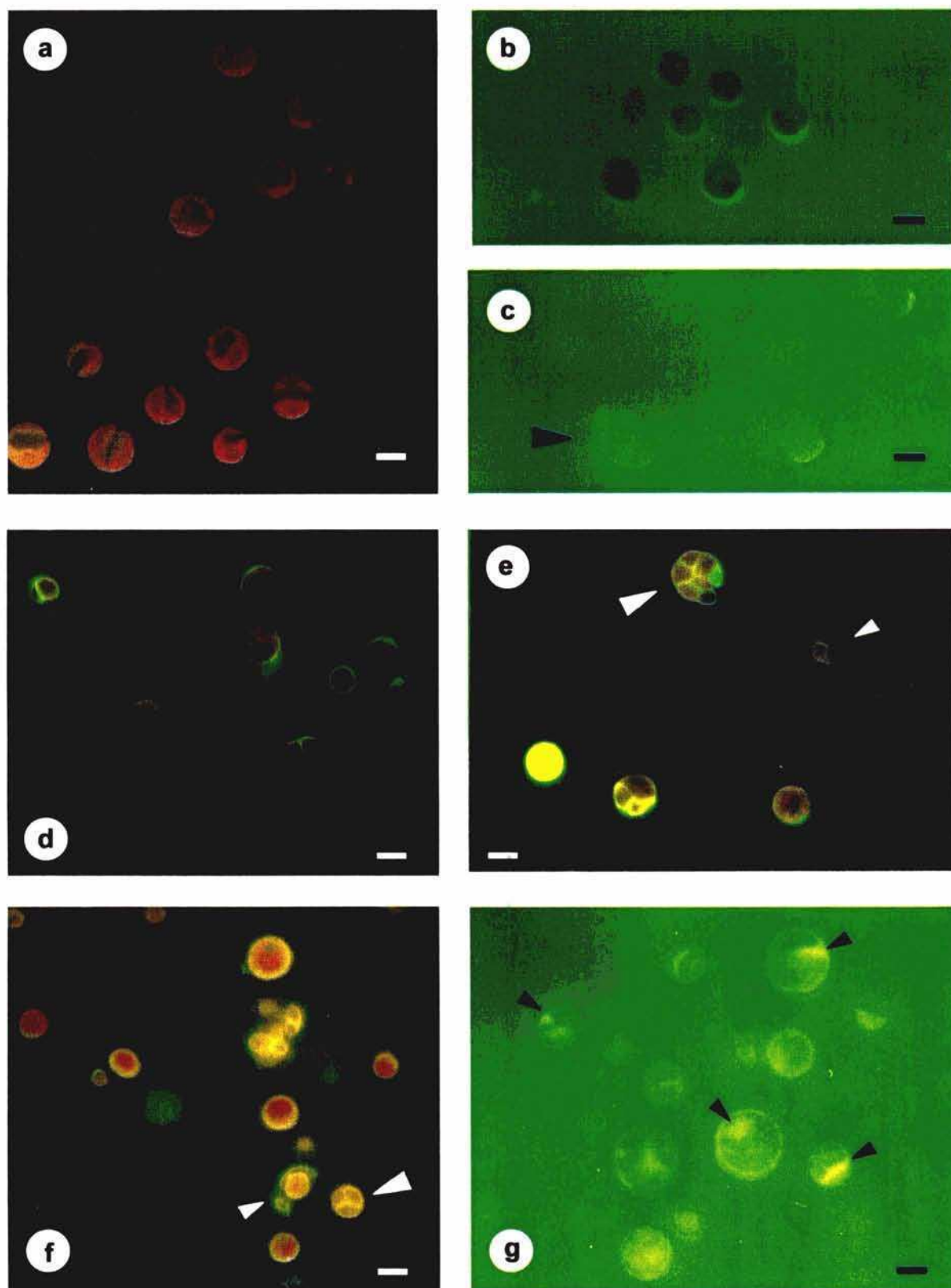


Figura 10. Microscopía de fluorescencia de células de *C. kessleri* cultivadas en BBM líquido. a: autofluorescencia de un conjunto de células en distintos estadios, donde se distingue el cloroplasto parietal; b – c: tinción con naranja de acridina; b: conjunto de células adultas donde se observa fluorescencia naranja-amarillenta en sus paredes celulares; c: restos de pared celular madre (flecha). d – f: tinción con berberina; d: células en distintos estadios, presentando fluorescencia amarilla en sus paredes; e: esporangios de cuatro (flecha pequeña) y ocho autosporas (flecha grande) con una marcada fluorescencia amarilla en sus paredes; f: células adultas, esporangio de cuatro autosporas (flecha grande) y autospora asociada a restos de pared celular madre (flecha pequeña), presentando una marcada fluorescencia amarilla en sus paredes celulares; g: conjunto de células tratadas con quinacrina; nótese las vacuolas con fluorescencia amarilla en su citoplasma (flechas). Escalas = 5 μ m.

I. 3. 2. Estudios ultraestructurales

Las observaciones en microscopio electrónico de transmisión evidenciaron caracteres ultraestructurales típicos de células de *Chlorella kessleri*. Se destacan: presencia de un núcleo levemente a claramente excéntrico, con un nucleolo de baja densidad electrónica (Figura 11 a y d); un cloroplasto parietal laminar que rodea toda la célula, dejando una delgada abertura (Figura 12 a y b); un pirenoide embebido en la matriz del cloroplasto, atravesado por una banda de dos tilacoides y rodeado por almidón (Figura 11 a y c, Figura 12 a y d); adicionalmente se observan gránulos de almidón entre las lamelas del cloroplasto (Figura 12 a y d); lamelas formadas por dos a cuatro tilacoides agrupados (Figuras 11 c y 12 c); secciones del mitocondrion, normalmente asociadas con el lado cóncavo del cloroplasto (Figura 11 a); pared celular de 60 a 80 nm de espesor, de estructura homogénea (Figura 10 b).

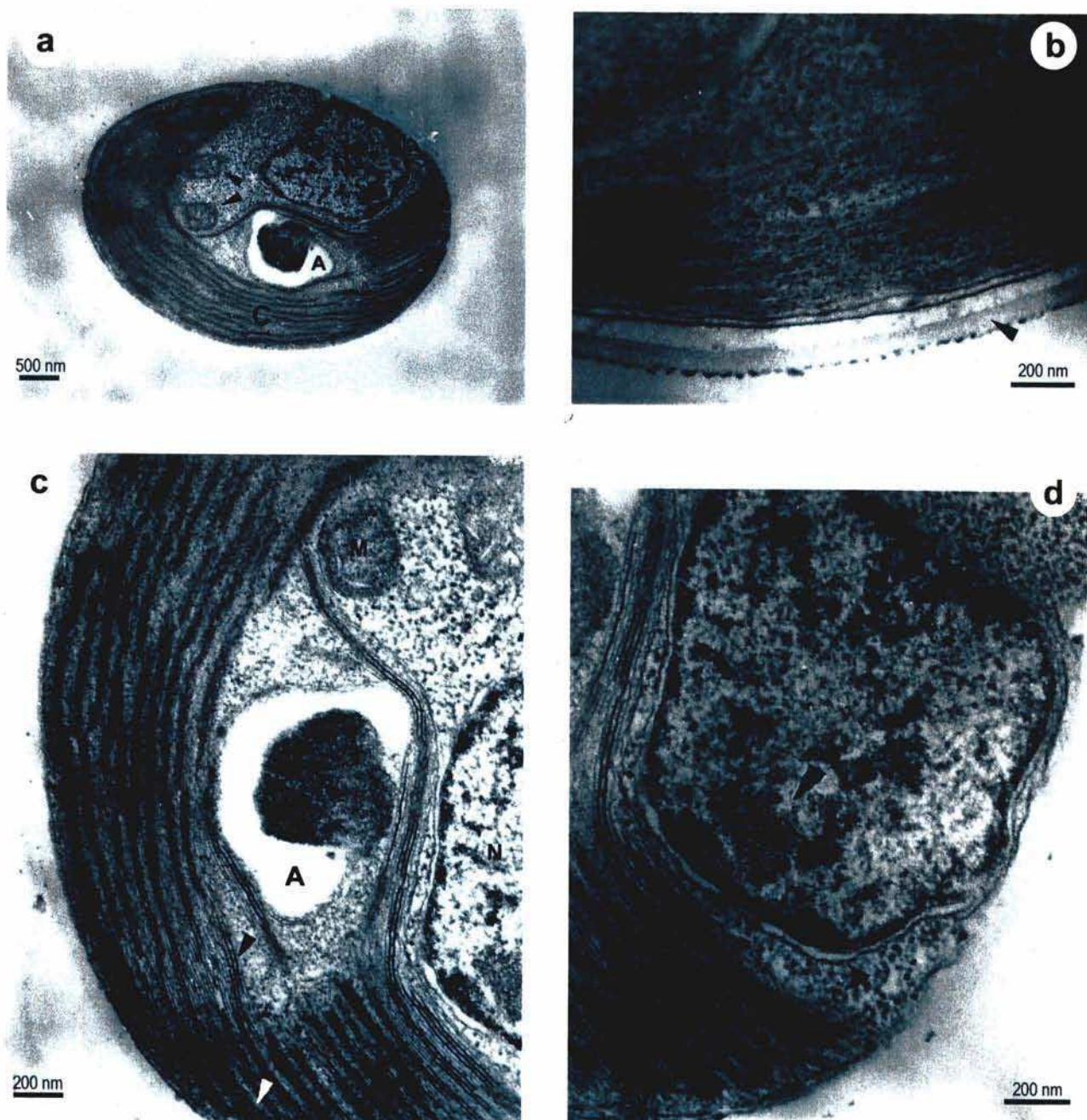


Figura 11. Microscopía electrónica de transmisión de la cepa BAFC CA10 de *Chlorella kessleri*. a: corte de una célula donde se observa el núcleo excéntrico, el cloroplasto parietal con un pirenoide y secciones del mitocondrion (flechas); b: detalle de la pared celular en un corte teñido con rojo de rutenio y coloración de Reynolds (flecha); c: detalle del cloroplasto, mostrando el pirenoide rodeado por una calota de almidón y los tilacoides apilados de a 2, 3 o 4 (flechas); d: detalle del núcleo rodeado por su doble membrana (flecha pequeña), donde se observa un nucleolo excéntrico de baja densidad electrónica (flecha grande). N: núcleo; M: mitocondria; C: cloroplasto; P: pirenoide; A: almidón.

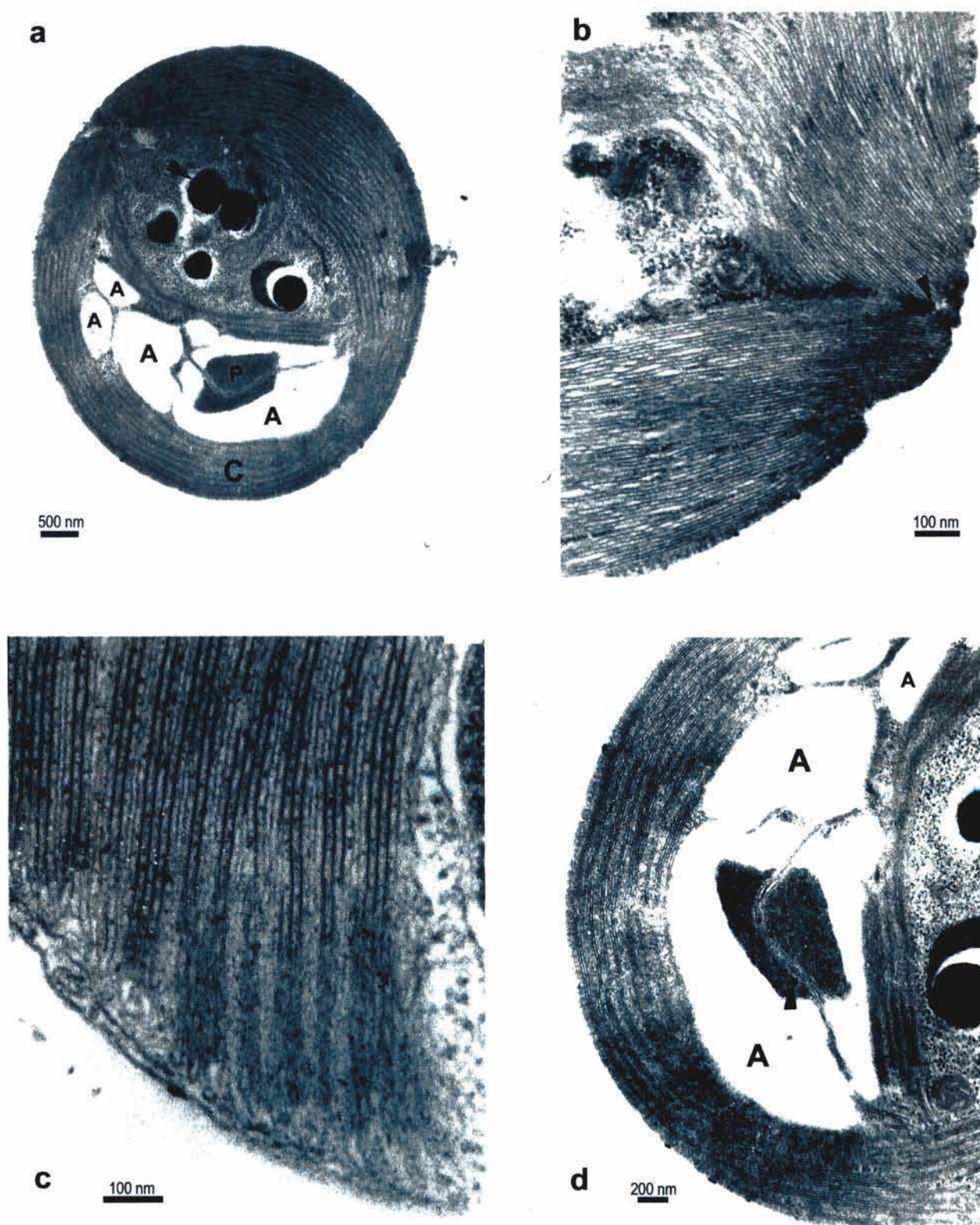


Figura 12. Microscopía electrónica de transmisión de la cepa BAFC CA10 de *Chlorella kessleri*. a: corte de una célula donde se observa el cloroplasto parietal rodeando toda la célula, gránulos de almidón rodeando el pirenoide y dispersos entre las lamelas y gránulos electrodensos en el citoplasma (flecha); b: detalle de a, mostrando la delgada abertura que deja el cloroplasto al rodear la célula (flecha); c: detalle de las lamelas del cloroplasto, donde se observan tilacoides apilados de a 2 a 4; d: lamela de dos tilacoides que bisecta al pirenoide (flecha). C: cloroplasto; P: pirenoide; A: almidón.

I. 3. 3. Estudios Quimiotaxonómicos

Los resultados de los estudios quimiotaxonómicos realizados se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6. Caracteres bioquímicos y fisiológicos de la cepa BAFC CA10 de *Chlorella kessleri*.

Hidrogenasa	Liq. Gel.	pH	% NaCl	Hidr. Almidón	Carot. Sec.
+	-	3	2	-	-

Actividad hidrogenasa (Hidrogenasa), liquefacción de gelatina (Liq. Gel.), hidrólisis de almidón (Hidr. Almidón), producción de carotenoides secundarios (Carot. Sec.), tolerancia al ácido (pH límite), tolerancia a la sal (% NaCl límite).

La cepa en estudio no degrada almidón, ya que al revelar las cajas con solución de I_2KI se obtuvo un color azul intenso homogéneo, sin detectarse áreas claras que indicaran ausencia del mismo. Por otro lado, tampoco es capaz de hidrolizar gelatina, ya que luego de 3 semanas de cultivo en el medio específico, no se observaron rastros de liquefacción del mismo. Es decir, que esta cepa no produce enzimas extracelulares capaces de hidrolizar dichos sustratos.

Tampoco produce carotenoides secundarios bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno. Luego de 4 semanas y luego de 3 meses de crecimiento en BBM y en 0,5BBM, los cultivos presentaron la coloración verde brillante típica de los cultivos con crecimiento normal, mientras que los cultivos en medio 0,01BBM crecieron muy poco y se tornaron pálidos. Los controles con *Trebouxia* sp., en cambio, mostraron la coloración verde típica únicamente en medio BBM, mientras que en 0,5BBM tomaron una coloración parda y en 0,01BBM tomaron una intensa coloración naranja. Al microscopio óptico, se observaron células con pigmentación normal para *C. kessleri* creciendo en BBM y en 0,5BBM y células deformadas y muy pálidas en 0,01BBM. En cambio, las células de *Trebouxia* sp. presentaron una gran acumulación de pigmentos naranjas que cubrían todo el citoplasma en los cultivos en 0,01BBM, tanto en los de 4 semanas como en los de 3 meses, y en los cultivos en 0,5BBM de 3 meses.

Para el estudio de tolerancia a la sal, se realizaron ensayos con concentraciones crecientes de NaCl (1%, 2% y 3%). En todos los casos se partió de cultivos con una concentración inicial

de $0,3 \times 10^5$ células/ml. Luego de dos meses de incubación, se midió el crecimiento en cada concentración de NaCl, estableciéndose el rango de tolerancia de esta cepa. El aumento del número de células en el medio conteniendo un 3% de NaCl fue mínimo (alcanzando $0,5 \pm 0,1 \times 10^5$ células/ml), y las células de estos cultivos se encontraban en su mayoría colapsadas. Se puede establecer, entonces, el límite máximo de tolerancia de esta cepa en un 2% de NaCl (Figura 13).

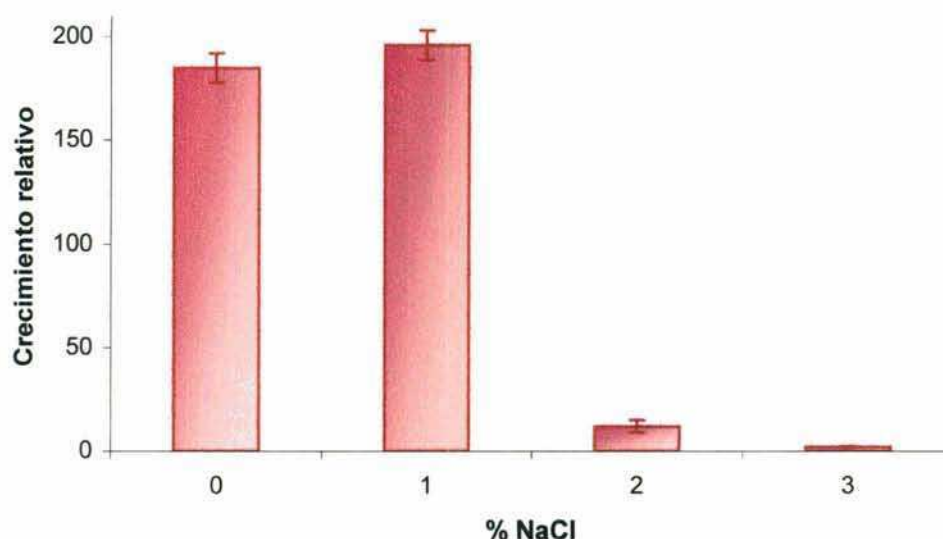


Figura 13. Crecimiento relativo $[(N^\circ \text{ células/ml final} - N^\circ \text{ células/ml inicial}) / N^\circ \text{ inicial}]$ de la cepa BAFC CA10 de *Chlorella kessleri* luego de dos meses de cultivo en medio BBM con el agregado de tres concentraciones de NaCl.

En cuanto a la tolerancia a la acidez, se determinó el límite inferior, analizando el crecimiento de la cepa en medio BBM a distintos pH, cuyos resultados se muestran en la Figura 14. Observando los resultados obtenidos a los 20 días y a los 3 meses de cultivo, puede establecerse que a mayor pH existe un mayor crecimiento. Pero comparando la biomasa alcanzada a ambos tiempos, se observa que si bien existe un mínimo incremento del número de células a pH 2,5, éste es despreciable frente al buen crecimiento obtenido entre pH 3 y 5, estableciéndose como límite de tolerancia para esta cepa, un pH de 3.

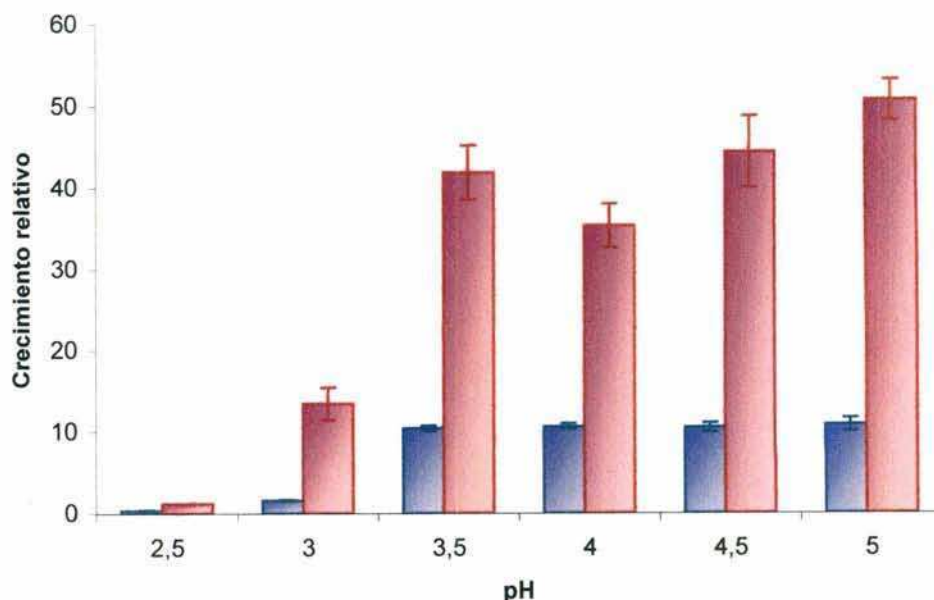


Figura 14. Crecimiento $[(N^{\circ} \text{ células/ml final} - N^{\circ} \text{ células/ml inicial}) / N^{\circ} \text{ inicial}]$ de la cepa BAFC CA10 de *Chlorella kessleri* luego de 20 días (■) y 3 meses (■) de cultivo en medio BBM a distinto pH.

Dado que las pruebas de detección de actividad hidrogenasa fueron realizadas con fines quimiotaxonómicos, sus resultados se presentan en forma cualitativa (Tabla 6). Luego de 24 h, y concordando con Kessler y Maifarth (1960), que estimaron entre 20 y 40 h el tiempo de adaptación requerido para la activación de la enzima hidrogenasa en *Chlorella*, pudo apreciarse un ascenso de líquido en la columna derecha del manómetro conectado al vaso de reacción que contenía aceptor de hidrógeno (Figura 5). Este ascenso indica una disminución de la presión parcial de hidrógeno debida a su consumo en la reducción de NaNO_2 :



En el vaso testigo (sin NaNO_2), la variación fue mínima, pudiendo deberse al consumo de hidrógeno en la reducción de aceptores celulares (Kessler y Maifarth 1960).

I. 3. 4. Estudios de la composición química de la pared celular

El producto PND que fue sometido a hidrólisis ácida, arrojó un 29 % de hidratos de carbono totales y un 3% de hexosaminas. Los resultados de los análisis de sus monosacáridos componentes se resumen en la Tabla 7. La fracción HS está constituida principalmente por xilosa (38%) y galactosa (29%), mientras que la fracción HR está constituida por un 100 % de N- acetilglucosamina.

Tabla 7. Composición de monosacáridos (en % Molar) de la matriz amorfa y de la matriz fibrilar de la pared celular de la cepa de *Chlorella kessleri*.

Monosacáridos	Matriz amorfa ^a	Matriz fibrilar ^b
Xilosa	38%	—
Galactosa	29%	—
Ramnosa	15 %	—
Glucosa	15%	—
Manosa	3%	—
N - acetilglucosamina	—	100%

Las determinaciones se realizaron de acuerdo a lo descrito en el ítem I.2.9. de Materiales y Métodos *a*: fracción HS, soluble luego de hidrólisis en TFA 2N; *b*: fracción HR resistente a hidrólisis en TFA 2N, soluble luego de hidrólisis en HCl 6N.

I. 4. DISCUSIÓN

Los estudios morfológicos que se realizaron en una instancia inicial, permitieron una primera aproximación a la identidad de la cepa de *Chlorella* aislada de la Laguna Verde. Sin embargo, las primeras características microscópicas observadas no permitían discernir entre su asignación a *C. vulgaris* o a *C. kessleri*. Teniendo en cuenta que la asignación de un organismo a un taxón determinado sólo puede decidirse analizando una combinación de distintos tipos de caracteres, se estudiaron diferentes aspectos bioquímicos, fisiológicos, morfológicos y ultraestructurales de la cepa BAFC CA10, para llegar a una mejor caracterización de la misma. Las cepas de *C. kessleri*, existentes en distintas colecciones de cultivos, habían sido antiguamente incluidas en *C. vulgaris*, pero posteriormente se las separó por presentar actividad hidrogenasa y alta tolerancia a la acidez (Kessler 1984). Sobre la base de los estudios morfológicos, ultraestructurales, bioquímicos y fisiológicos realizados en la cepa de la Laguna Verde, puede asegurarse que sus caracteres coinciden con los especificados por distintos autores para *C. kessleri* Fott et Nováková. De acuerdo a lo establecido por Kessler (1984 y 1992) y Huss *et al.* (1999) para las cepas de *C. kessleri* de la SAG y de la UTEX, la cepa de la Laguna Verde comparte con aquellas las siguientes características: 1) presencia de actividad hidrogenasa en anaerobiosis, 2) ausencia de enzimas extracelulares que hidrolizan almidón, 3) ausencia de enzimas extracelulares que licúan gelatina, 4) ausencia de producción de carotenoides secundarios en condiciones de deficiencia de nitrógeno, 5) pH 3 como límite de tolerancia a la acidez y 6) 2% NaCl como límite de tolerancia a la salinidad (Tablas 2 y 6).

La clasificación quimiotaxonómica de las especies del género *Chlorella* (Tabla 2) coincide con la clasificación basada en la composición de la pared celular (Figura 1 y Tabla 3) y puede decirse que usando este último marcador taxonómico, en conjunto con los marcadores bioquímicos y fisiológicos, las especies de *Chlorella* pueden ser mejor clasificadas. Basándose en características de la pared celular, Takeda (1991) separó a la mayoría de las cepas de *C. kessleri* de las de *C. vulgaris* por su tinción negativa con rojo de rutenio y por la presencia de fucosa en la matriz amorfa de su pared, sustentando así también la clasificación quimiotaxonómica (Tablas 2 y 3). Entre los polisacáridos fibrilares que componen las paredes celulares de las algas, uno de los de más amplia distribución es la celulosa, sin embargo, dentro del género *Chlorella sensu lato*, la fracción fibrilar de sus paredes generalmente está compuesta por otro tipo de polisacáridos, encontrándose el polímero hidrofóbico algaenano,

quitina (polímero de N - acetilglucosamina) o mananos fibrilares (Burczyk *et al.* 1995; Takeda 1996). Las observaciones microscópicas de las células de la cepa BAFC CA10 de *C. kessleri* tratadas con distintos colorantes específicos, indicaron la ausencia de celulosa en sus paredes (fluorescencia negativa con calcofluor), ausencia de algaenano (fluorescencia negativa con primulina) y presencia de quitina (tinción positiva con cloruro de zinc iodado) (Tabla 5). Si bien la tinción positiva con berberina ha sido reportada como marcadora de compuestos fenólicos hidrofóbicos tipo lignina (Brundrett *et al.* 1988; Lulai y Morgan 1992), se puede presumir que el polímero hidrofóbico de N - acetilglucosamina que conforma la pared rígida de *C. kessleri* podría ser el responsable de la marcada fluorescencia amarilla que se observó en las paredes celulares con la aplicación de este fluorocromo (Tabla 5 y Figura 10 d - f). La presencia de quitina en la pared celular de la cepa en estudio fue corroborada mediante el análisis de su composición química. Coincidiendo con los estudios de pared celular realizados por Takeda (1991, 1993 y 1996), en la cepa de *C. kessleri* de la Laguna Verde también se detectó N - acetilglucosamina como único componente de la pared rígida, y xilosa, ramnosa y galactosa como componentes principales de la matriz amorfa (Tabla 7). De acuerdo con Takeda (1996), la determinación de los azúcares de la pared rígida es el primer paso para la clasificación de cepas de *Chlorella* y sus resultados sugieren que *C. kessleri* junto con *C. vulgaris* y *C. sorokiniana*, que comparten la presencia de glucosamina, son muy diferentes de las otras especies. Este carácter tendría un valor taxonómico comparable al de la tinción de Gram en las Eubacterias y, de acuerdo con Takeda (*op. cit.*) es lo suficientemente estable como para asignarle valor taxonómico.

En base al índice de tres pasos, elaborado por Takeda (1991) para distintas cepas del género *Chlorella*, se estableció que las cepas 211-11g, 211-11h, 211-11h/9, 211-11h/20, CV 11h y CV 125 de *C. kessleri* de la SAG presentan el índice 2.2.2 (Figura 1) y que la composición de azúcares de sus matrices amorfas es la misma o similar (Tabla 3). Si bien en este trabajo de tesis no se determinó la anisotropía de la pared celular, la determinación de N - acetilglucosamina como único componente de la pared rígida y la ausencia de tinción con rojo de rutenio en la pared celular de la cepa de la Laguna Verde, coinciden con los dos primeros pasos (2.2) del índice establecido por Takeda (*op. cit.*) para *C. kessleri*. Cabe destacar, que si bien la tinción de la pared celular con rojo de rutenio resultó negativa, ello no es indicativo de ausencia de polisacáridos ácidos, ya que la reacción rojo de rutenio - pectina depende del grado de grupos carboxilos expuestos, por lo que sólo se obtiene coloración en presencia de altas concentraciones de sustancias pécticas (Krishnamurthy 1999). La coloración roja

obtenida con azul de toluidina y la fluorescencia naranja-amarillenta obtenida con naranja de acridina señalarían que existen polisacáridos ácidos o pécticos en la pared de *C. kessleri*, pero éstos, presumiblemente, presentarían una baja proporción de grupos carboxilos expuestos (Tabla 5 y Figuras 9 y 10 b - c).

Como se señalara en la introducción, también es importante la comparación de la composición de azúcares de la matriz de hemicelulosa (o amorfa) de la pared celular. La matriz de hemicelulosa de las cepas pertenecientes al grupo con pared rígida de N - acetilglucosamina está constituida principalmente por ramnosa, galactosa y xilosa, normalmente presentando un porcentaje de ramnosa mayor al de galactosa y al de xilosa y pudiendo encontrarse, además, porcentajes variables de glucosa (Takeda 1996). En la cepa aquí estudiada, el porcentaje de xilosa fue mayor que el de galactosa y éste, mayor que el de ramnosa, la cual se encontraba en un porcentaje similar al de glucosa (Tabla 7). La composición cualitativa de los azúcares, tanto de la matriz rígida como de la matriz de hemicelulosa, es constante a través de todo el ciclo celular, pero sus cantidades pueden variar dependiendo de la etapa de crecimiento en que se encuentren las células (Takeda y Hirokawa 1978 y 1984). Las diferencias cuantitativas encontradas en la composición de la matriz de hemicelulosa de la cepa BAFC CA10 de *C. kessleri*, con respecto a las reportadas para otras cepas de esta especie, pueden deberse a la realización de las determinaciones químicas en etapas de crecimiento diferentes. Si bien la presencia de fucosa en la matriz de hemicelulosa parece ser una característica típica de *C. kessleri*, no se registró la presencia de este azúcar en la pared de la cepa de la Laguna Verde. En este sentido, puede señalarse que Takeda (1995), de acuerdo al índice de sus paredes celulares (2.2.2), asignó ocho nuevas cepas a *C. kessleri*, y tampoco detectó fucosa en sus paredes celulares.

En los análisis de secuenciación del gen que codifica para el 18S rARN se resuelve claramente el origen monofilético de la especie tipo del género, *Chlorella vulgaris*, con *C. sorokiniana*, *C. lobophora* y *C. kessleri*. Según Friedl (1997), esta agrupación podría establecerse como el orden Chlorellales dentro de la clase Trebouxioophyceae. Este esquema es bastante diferente de los esquemas taxonómicos previos, en los cuales todas las algas verdes cocoides con pared celular estaban incluidas dentro del orden Chlorococcales en la clase Chlorophyceae (Komárek y Fott 1983). Adicionalmente, Friedl (*op. cit.*) y Huss *et al.* (1999) proponen que sólo *C. vulgaris*, *C. lobophora*, *C. sorokiniana* y *C. kessleri*, dentro de la clase Trebouxioophyceae, pueden representar el género *Chlorella* Beijerinck (1890) (*Chlorella*

sensu stricto), mientras que aquellas especies que tienen su origen en otros linajes de las Trebouxiophyceae (*C. saccharophila*, *C. mirabilis*, *C. ellipsoidea*, *C. luteoviridis*, *C. protothecoides*, cepa Bethesda C-1.1.9 de *C. minutissima*) o de las Chlorophyceae (*C. zofingiensis*, *C. homosphaera*, cepa Lefèvre de *C. minutissima*, las tres variedades de *C. fusca*) necesitan ser asignadas a otros géneros (Figura 2). En relación con esto último, algunos autores ya han propuesto la transferencia de algunas especies a nuevos taxa. *C. zofingiensis*, *C. homosphaera* y *C. protothecoides* fueron transferidas por Kalina y Punčochárová (1987) a *Mychonastes zofingiensis*, *M. homosphaera* y *Auxenochlorella protothecoides*, respectivamente; las tres variedades de *C. fusca* fueron transferidas al género *Scenedesmus* (Hegewald y Schnepf 1991; Kessler *et al.* 1997; Huss *et al.* 1999) y una cepa de *C. saccharophila* fue incluida en un nuevo género como *Watanabea reniformis* (Hanagata *et al.* 1998).

Como se comentara antes, los trabajos de Takeda (1991, 1993 y 1996) han demostrado que la composición de azúcares de la pared celular es un carácter útil para la sistemática de *Chlorella*. Así, las especies de *Chlorella sensu stricto*, *C. vulgaris*, *C. sorokiniana* y *C. kessleri*, también se caracterizan por presentar la misma composición en su pared celular rígida (exclusivamente N – acetilglucosamina), diferenciándolas de las otras especies de *Chlorella sensu lato*. Adicionalmente, en un estudio de la ultraestructura del pirenoide, las mismas especies pueden diferenciarse de las otras por la presencia de un tilacoide doble que bisecta la matriz del pirenoide (Ikeda y Takeda 1995). Esta última característica también fue confirmada, en este trabajo de tesis, para la cepa BAFC CA10 de *C. kessleri* (Figura 12 a y d).

Frente a este panorama, se decidió adoptar la nueva clasificación filogenética de *Chlorella* (Friedl 1997; Huss *et al.* 1999), en cuyo contexto, la especie *C. kessleri* conjuntamente con *C. vulgaris*, *C. lobophora* y *C. sorokiniana* corresponderían el “verdadero” género *Chlorella* Beijerinck incluido dentro del orden Chlorellales (Trebouxiophyceae, Chlorophyta).

Aunque algunas especies del género *Chlorella* son cosmopolitas y se encuentran por lo general en todo tipo de ambientes, la presencia de poblaciones naturales de alta densidad, como la detectada para *C. kessleri* en la Laguna Verde, ocurre principalmente en aguas contaminadas o en cuerpos de agua artificiales (Fott y Nováková 1969; Margalef 1983). Las Termas de Copahue no presentan esas características. Debido a su relación con procesos volcánicos y a su elevada acidez, muy pocos organismos pueden prosperar en ese tipo de

cuerpos de agua (Margalef 1983; Huss *et al.* 2002). La presencia de especies de *Chlorella* en ambientes de pH muy bajo, parece estar restringida a los suelos ácidos, habiéndose reportado la presencia de *C. protothecoides* var. *acidicola* (aún no transferida a un nuevo género; Huss *et al.* 2002) y *C. saccharophila* en suelos de origen volcánico, asociados a fumarolas. En cambio, prácticamente no han sido registradas en cuerpos de agua ácidos (Huss *et al.* 2002). En relación con todo esto, las muestras recolectadas en la Laguna Verde presentaban una diversidad específica muy baja y *C. kessleri* no solamente era la especie dominante, sino que además se encontraba en concentraciones muy altas, del orden de 2×10^7 células/ml (Juárez y Vélez 1993). De acuerdo con el análisis de los límites de tolerancia del género *Chlorella* realizado por Kessler (1985b) y con los estudios fisiológicos realizados en este trabajo de tesis, *C. kessleri* tolera valores de pH menores que 4 y temperaturas superiores a 34° C, por lo cual sería una de las pocas especies de este género que prospera cuando ambas condiciones se dan simultáneamente. A partir de lo expuesto, puede decirse que las condiciones extremas de pH y temperatura de las aguas de Copahue, no serían limitantes para el desarrollo de la cepa de *C. kessleri* aquí estudiada, determinando que ésta constituya la especie dominante en la Laguna Verde.

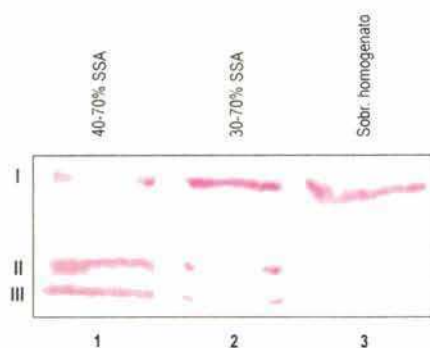
Como se señaló anteriormente, los estudios realizados en este capítulo establecen que la cepa BAFC CA 10 corresponde a la especie *C. kessleri*. Este hallazgo representa la única cita para la Argentina y el segundo registro a nivel mundial en un ambiente natural, ya que esta especie sólo había sido previamente reportada para Rusia (aerofítica).

Por otro lado, se conoce poco sobre las comunidades de microalgas que habitan ambientes acuáticos ácidos de origen volcánico. Con respecto al género *Chlorella*, sólo se citó con anterioridad la especie *C. saccharophila* (Franken y Franken 1977; Huss *et al.* 2002). Por lo tanto, el hallazgo de *C. kessleri* en la Laguna Verde, cuerpo de agua asociado a fumarolas, constituye un segundo registro mundial de una especie de *Chlorella* en este tipo de ambientes.

I. 5. CONCLUSIONES

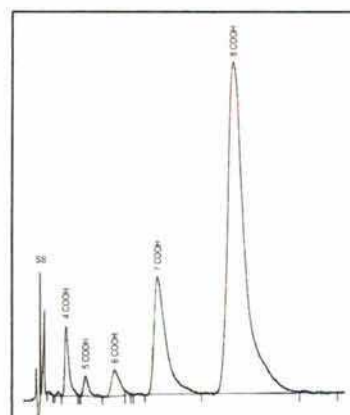
Sobre la base de los resultados obtenidos en los estudios morfológicos, ultraestructurales, bioquímicos y fisiológicos, realizados en este capítulo, puede concluirse que:

- ❖ La cepa BAFC CA10, aislada de la Laguna Verde, corresponde a la especie *C. kessleri* Fott y Nováková (Trebouxiophyceae, Chlorophyta).
- ❖ El hallazgo de *C. kessleri* en la Laguna Verde constituye el primer registro para la Argentina, el segundo registro a nivel mundial en un ambiente natural y el primer registro de esta especie en un ambiente de origen volcánico.
- ❖ Los caracteres morfológicos ultraestructurales, bioquímicos y fisiológicos sobresalientes que presenta esta cepa y que permiten su asignación específica son: Cloroplasto parietal laminar ocupando toda la célula y dejando una pequeña abertura. Pirenoide embebido en la matriz del cloroplasto, bisectado por una banda de dos tilacoides. Pared celular homogénea, con N- acetilglucosamina como único componente de su matriz rígida y con xilosa, manosa y ramnosa como componentes principales de su matriz amorfa. Presencia de actividad hidrogenasa. Ausencia de producción de carotenoides secundarios. Ausencia de enzimas extracelulares que hidrolizan almidón y gelatina. pH 3 y 2% NaCl como límites de tolerancia para su crecimiento.
- ❖ Las características bioquímicas y fisiológicas de esta cepa permitirían su crecimiento en un cuerpo de agua donde existen condiciones extremas, como la Laguna Verde, determinando su dominancia en el fitoplancton del mismo.



CAPÍTULO II

ESTUDIOS DE ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA SÍNTESIS DE LA CLOROFILA EN *CHLORELLA* *KESSLERI* (TREBOUXIOPHYCEAE, CHLOROPHYTA)



II. 1. INTRODUCCIÓN

Las porfirinas son compuestos tetrapirrólicos que desempeñan una importante función en la bioquímica de los seres vivos. Son la base de la estructura de pigmentos tales como las clorofilas y el hemo, que poseen una distribución biológica universal y están involucrados en los más antiguos fenómenos metabólicos de la tierra. Distintas hemoproteínas participan en el transporte del oxígeno y de los electrones, en tanto que las clorofilas y bacterioclorofilas catalizan la conversión de energía solar en energía química (Rebeiz *et al.* 1994). Las porfirinas y sus derivados también están presentes en otras biomoléculas de vital importancia (citocromo P₄₅₀, vitamina B₁₂), cuya biosíntesis fue contemporánea con la aparición de la vida en el planeta (Dailey 1997; Porra 1997).

Las primeras evidencias del origen biosintético común del hemo y de las clorofilas fueron obtenidas a fines de la década del 40 por Granick, trabajando con mutantes de *Chlorella* (Granick 1948). Estudios posteriores llevaron a la conclusión de que el hemo y las clorofilas tienen un camino biosintético común hasta protoporfirina IX (Proto IX). Este camino diverge después de Proto IX, ya que por inserción de hierro lleva a la síntesis del hemo y por inserción de magnesio va hacia la síntesis de las clorofilas (Granick 1948 y 1971; Granick y Beale 1978; Grimm 1998). Además del hemo y de las clorofilas, los productos del camino biosintético de las porfirinas incluyen a la vitamina B₁₂, al sirohemo (grupo prostético de algunas nitrito y sulfito reductasas), a las bilinas (entre las que se encuentran los pigmentos fotosintéticos accesorios de Cyanophyta, Rhodophyta y Cryptophyta) y al cofactor quelante de níquel F₄₃₀ (coenzima presente en bacterias metanogénicas, involucrada en la reducción de puentes metil-sulfuro) (Beale 1978; Leeper 1985; Martins *et al.* 2001) (Figura 1).

Las clorofilas y el protohemo son los principales productos finales del camino de los tetrapirroles en plantas y en algas (Grimm 1998). En estos organismos, el camino completo de síntesis de las clorofilas se localizaría exclusivamente en los plástidos, mientras que parte del protoporfirinógeno IX se exportaría a las mitocondrias y sería el precursor en la biosíntesis del hemo (Gómez-Silva *et al.* 1985; Smith *et al.* 1993; Jacobs y Jacobs 1993; Reinbothe y Reinbothe 1996) (Figura 2). Algunos intermediarios del camino de los tetrapirroles son conocidos fotosensibilizadores, usados como herbicidas y en terapia fotodinámica. Cuando existe acumulación de los mismos, estos absorben energía radiante y producen especies reactivas de oxígeno (principalmente oxígeno singulete). Sin embargo, bajo condiciones normales de crecimiento, existe una fina regulación que mantiene controlada la concentración de estos intermediarios de la biosíntesis de las clorofilas y el hemo, por lo que el riesgo de sufrir daño fotooxidativo es bajo (Mock *et al.* 1998).

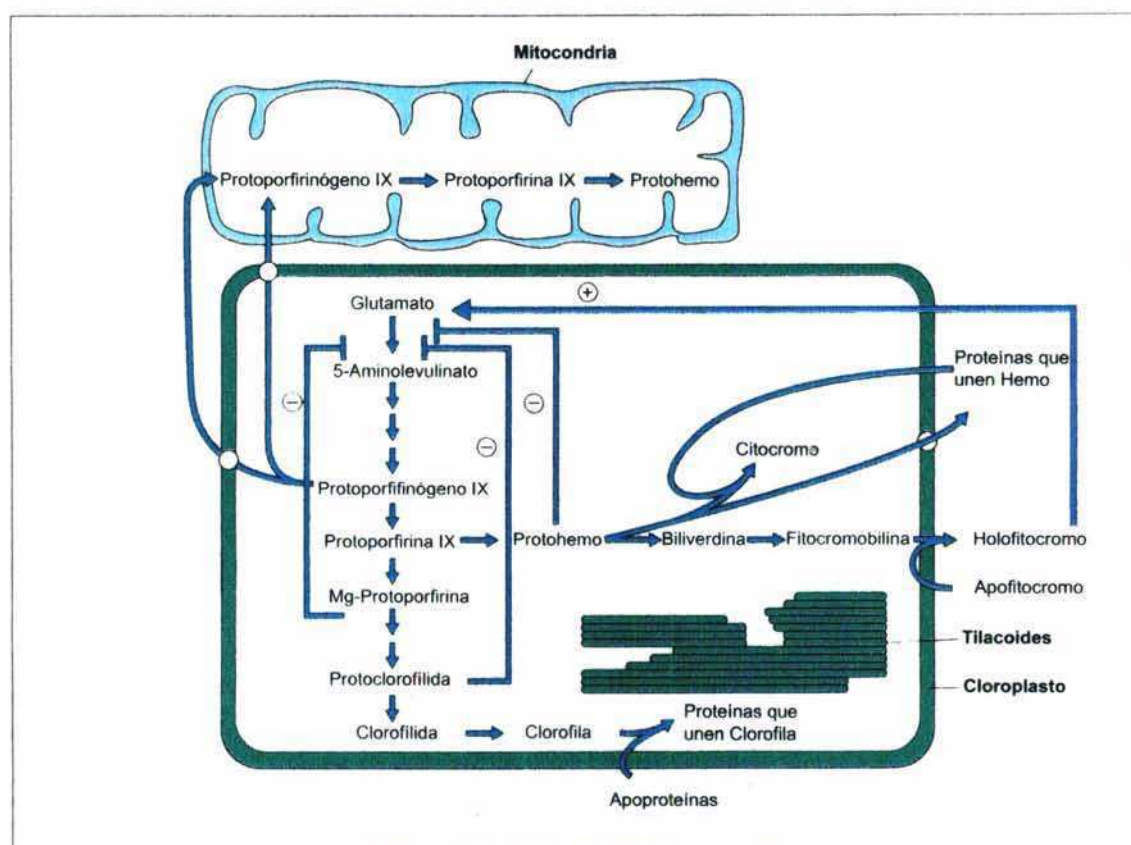


Figura 2. Biosíntesis de tetrapirroles en los cloroplastos y las mitocondrias de plantas y algas. Los primeros pasos del camino (desde glutamato hasta Proto IX) se localizan exclusivamente en el cloroplasto. A partir de ese punto, la biosíntesis se ramifica hacia la síntesis del hemo mitocondrial y hacia el camino metabólico de los tetrapirroles plastidiales (clorofilas y protohemo). Modificado a partir de Grimm (1998).

El primer precursor de la biosíntesis de los tetrapirroles celulares es el ácido δ -aminolevulínico (ALA). La formación de este compuesto puede ocurrir por dos caminos diferentes (Figura 3 y Tabla 1). En animales y algunas bacterias, este paso involucra la condensación de glicina con succinil-CoA para formar ALA y CO₂, mediante una reacción catalizada por la enzima ALA sintetasa (ALAS) (E.C.2.3.1.37). Si bien, algunos trabajos realizados en plantas y algas, han reportado la formación de ALA vía ALAS (Wider de Xifra *et al.* 1971; Lombardo *et al.* 1988; Mayer y Beale 1992), también existen trabajos, aplicando métodos colorimétricos y marcación radioactiva, en los que no se ha podido detectar dicha actividad (Porra y Grimme 1974; Gómez-Silva *et al.* 1985). En plantas superiores, algas, cianobacterias y muchas bacterias fotosintéticas y no fotosintéticas el ALA se forma, principalmente, a partir de glutamato o de α -ceto-glutarato, en una ruta que involucra 3 enzimas (Chen *et al.* 1990; Reinbothe y Reinbothe 1996; Santana *et al.* 1998). Esta ruta (Figura 3a), descrita por primera vez por Beale y Castelfranco (1973), se denomina “camino de 5 carbonos”, para distinguirla de la que ocurre vía ALAS, que se denomina “camino de Shemin o de 4 carbonos”. En la ruta de 5 carbonos, primeramente, la glutamil tARN sintetasa activa al glutamato formando glutamil tARN (Schön *et al.* 1986), este último es reducido por la glutamil tARN reductasa NADPH-dependiente para formar glutamato-1-semialdehído (GSA) y, finalmente, el GSA es transaminado por una aminotransferasa para formar ALA (Wang *et al.* 1984; Schneegurt y Beale 1988). Además se sugirió que, en un camino alternativo (Figura 3b), el glutamato es convertido en α -ceto-glutarato, que luego es reducido a γ,δ -dioxovalerato (DOVA) y éste finalmente es transaminado, en presencia de un dador de grupos amino, por medio de la enzima DOVA transaminasa (DOVAT) (EC 2.6.1.43) para formar ALA (Klein *et al.* 1980; Castelfranco y Beale 1983; Leeper 1985; Breu y Dörnemann 1988). La existencia de este camino, vía DOVAT, fue detectada en algunas Chlorophyta como *Scenedesmus obliquus* (Breu y Dörnemann 1988; Dörnemann *et al.* 1990), *Chlorella fusca* (actualmente *Scenedesmus abundans*) (Meisch *et al.* 1983), *Chlorella regularis* (Shioi *et al.* 1984) y *Chlorella vulgaris* (Gassman *et al.* 1968) y en la Euglenophyta *Euglena gracilis* (Salvador 1978; Lombardo *et al.* 1989). Los estudios realizados por Gassman *et al.* (1968), Meisch *et al.* (1983) y Lombardo *et al.* (1989), revelaron que 17 aminoácidos distintos podían actuar como dadores de grupos amino durante la transaminación por DOVAT, siendo los más efectivos el ácido L-glutámico, la L-alanina y la L-fenilalanina. Como se detalla en la Tabla 1, la ruta de 5 carbonos ha sido confirmada en plantas superiores y en distintos grupos de algas.

Por otra parte, en *Euglena* (Weinstein y Beale 1983; Mayer *et al.* 1987; Lombardo *et al.* 1988) y en *Scenedesmus obliquus* (Klein *et al.* 1980), se ha postulado que coexisten las dos rutas de síntesis de ALA. El ALA que sirve como precursor de las clorofilas se sintetizaría únicamente por la ruta de 5 carbonos (Beale *et al.* 1981; Weinstein y Beale 1983; Okazaki *et al.* 1990), mientras que el ALA que se usa para la síntesis de tetrapirroles mitocondriales se formaría exclusivamente por la ruta del ALAS (Beale *et al.* 1981; Weinstein y Beale 1983).

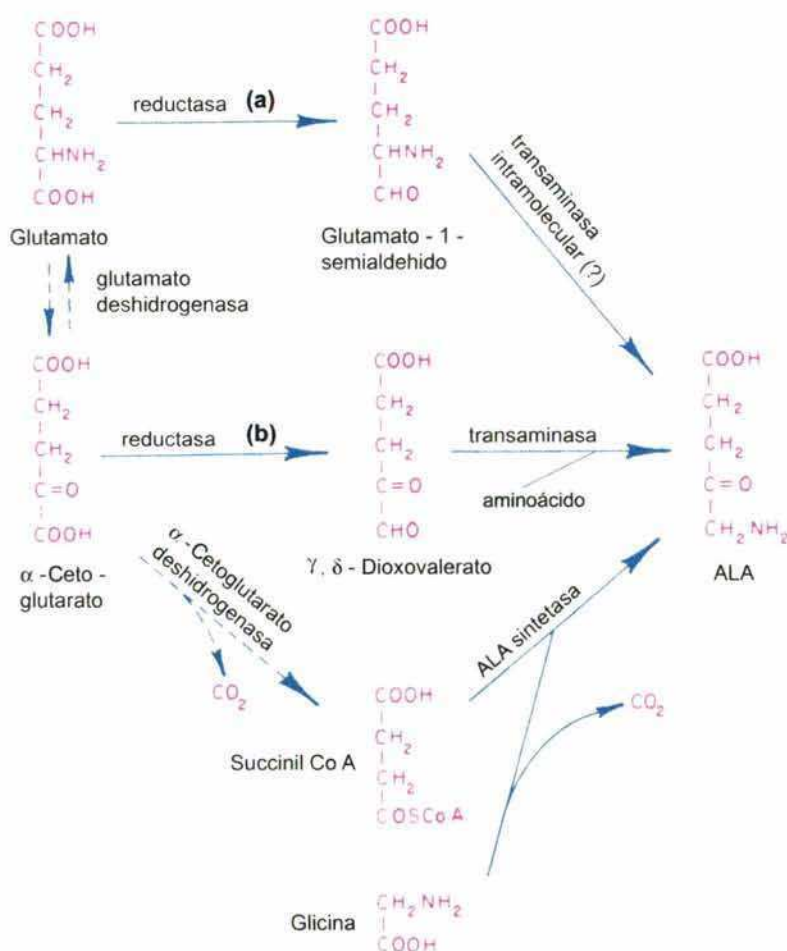


Figura 3. Vías de síntesis del ALA propuestas para plantas y algas. (a): Camino de 5 carbonos a través de GSA. (b): Camino de 5 carbonos a través de γ, δ - DOVA. Tomado de Castelfranco y Beale (1983).

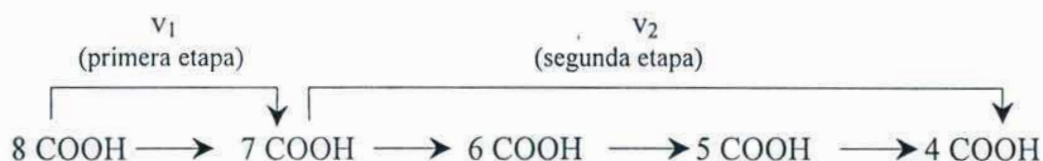
Tabla 1. Distribución de los dos caminos de síntesis de ALA.

Síntesis desde Glutamato o α -Cetoglutarato	Síntesis desde Succinil CoA y Glicina
Bacteria	
<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Chromatium vinosum</i> , <i>Prosthecochloris aesturii</i> , <i>Bacteroides</i> <i>rumenicola-brevis</i> , <i>Clostridium</i> <i>tetanomorphum</i> , <i>Clostridium thermoaceticum</i> , <i>Eubacterium limosum</i> , <i>Arthrobacter</i> <i>globiformis</i> , <i>Sulfolobus solfataricus</i> , <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> , <i>Halobacterium salinarium</i>	<i>Rhizobium melilotii</i> , <i>Rhodobacter spheroides</i> , <i>Rhodospirillum rubrum</i> , <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , <i>Spirillum itersonii</i> , <i>Pseudomonas denitrificans</i> , <i>Propionibacterium shermanii</i> , <i>Streptomyces</i> <i>xanthochromogenus</i> , <i>Arthrobacter globiformis</i>
Cyanophyta	
<i>Anabaena variabilis</i> , <i>Anacystis nidulans</i> , <i>Spirulina platensis</i> , <i>Fremyella displosiphon</i> , <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002, <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	
Prochlorophyta	
<i>Prochlorothrix hollandica</i>	
Chlorophyta	
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> , <i>Chlorella fusca</i> , <i>Chlorella regularis</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Scenedesmus obliquus</i>	<i>Scenedesmus obliquus</i>
Rhodophyta	
<i>Cyanidium caldarium</i>	
Euglenophyta	
<i>Euglena gracilis</i>	<i>Euglena gracilis</i>
Fungi	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Torula utilis</i>
Bryophyta	
<i>Camptothecium</i> sp.	
Angiospermas	
<i>Hordeum vulgare</i> , <i>Spinaca oleraceae</i> , <i>Zea</i> <i>mays</i> , <i>Cucurbita pepo</i> , <i>Triticum aestivum</i> , <i>Helianthus tuberosus</i> , <i>Arachis hypogea</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i>	
Tejidos animales	mitocondrias

Modificada de Kannangara *et al.* (1988) y ampliada en base a Porra (1997).

A partir del primer precursor del camino, la síntesis continúa con la condensación de dos moléculas de ALA para dar un derivado pirrólico, el porfobilinógeno (PBG). Luego, a partir de este último, se forma el uroporfirinógeno III (Urogen III), por la acción cooperativa de las enzimas Urogen I sintetasa y Urogen III cosintetasa. La conversión de Urogen III a coproporfirinógeno III (Coprogen III), se lleva a cabo por acción de la uroporfirinógeno decarboxilasa (UroD), en tanto que la coprogenasa cataliza la decarboxilación oxidativa (pérdida de 2 moléculas de CO_2 y de 4 átomos de hidrógeno) del Coprogen III para dar protoporfirinógeno IX (Protogen IX). La oxidación de este último (pérdida de 6 átomos de hidrógeno) lleva a la formación de Proto IX, el precursor común para las clorofilas y el protohemo. La magnesio quelatasa y la ferroquelatasa insertan Mg^{++} y Fe^{++} en la Proto IX, entrando así en el camino biosintético de las clorofilas y del hemo, respectivamente. La Mg-Proto es modificada, secuencialmente, por la formación de un quinto anillo isocíclico y por reducciones de las cadenas laterales del anillo tetrapirrólico. Finalmente, la clorofilida resultante es esterificada con fitol para sintetizar clorofila *a* (Figura 1).

La UroD (E. C. 4. 1. 1. 37) es la quinta enzima del camino metabólico común del Hemo y de las clorofilas. Esta enzima cataliza la eliminación secuencial de los 4 grupos carboxilos de las cadenas acéticas laterales del Urogen III (sustrato de 8 carboxilos) para finalmente producir el Coprogen III (de 4 carboxilos) (Jackson *et al.* 1976). En los organismos estudiados, se ha planteado que esta reacción ocurriría en dos etapas:



La primer etapa involucraría una rápida eliminación del primer grupo carboxilo (COOH) del Urogen III para dar un compuesto con 7 COOH (heptacarboxiporfirinógeno). En la segunda etapa se eliminarían secuencialmente los otros 3 grupos COOH dando hexacarboxiporfirinógeno de 6 COOH (hexagen), pentacarboxiporfirinógeno de 5 COOH (pentagen) y, finalmente, el Coprogen III. La decarboxilación del 7 COOH porfirinógeno constituiría el paso velocidad limitante (Tomio *et al.* 1970; García *et al.* 1973; Koopmann *et al.* 1986; Ríos de Molina *et al.* 1987; Juknat *et al.* 1989). La UroD es una enzima clave de este camino biosintético. Todos los tetrapirroles celulares (clorofila, hemo, vitamina B_{12} , sirohemo y citocromos) derivan del Urogen III, que precede al primer punto de ramificación de la vía hacia estos compuestos. La C-metilación del Urogen III inicia la síntesis de la vitamina B_{12} ,

los sirohemos y el cofactor quelante de níquel F₄₃₀, mientras que su decarboxilación, por acción de la UroD, lleva a la biosíntesis del hemo, de las clorofilas y de las bacterioclorofilas (Mock *et al.* 1995; Martins *et al.* 2001). Por encontrarse en el primer punto de ramificación del camino biosintético de los tetrapirroles celulares, esta enzima está potencialmente involucrada en el control del flujo de precursores a través de él. Su regulación debe garantizar un flujo continuo de precursores de porfirinas en respuesta a distintos factores endógenos y exógenos, para asegurar una adaptación a las necesidades variables de productos tetrapirrólicos finales, durante el desarrollo del organismo, y para prevenir la acumulación de estas moléculas, altamente fotorreactivas, que podrían producir daño fotodinámico celular (Grimm 1998; Martins *et al.* 2001).

Como se planteó en el párrafo anterior, debido a su ubicación en el primer punto de ramificación del camino metabólico de los tetrapirroles, la UroD es una enzima clave para la biosíntesis del hemo y de las clorofilas. Además, presenta características que la convierten en una enzima muy particular: es la única decarboxilasa conocida que no requiere cofactores (Dailey 1997; Whitby *et al.* 1998; Martins *et al.* 2001), cataliza 4 reacciones sucesivas para convertir su sustrato (Urogen III) en su producto final (Coprogen III) (Koopmann *et al.* 1986; Ríos de Molina *et al.* 1987; Martins *et al.* 2001) y es altamente sensible a metales, drogas y xenobióticos como los hidrocarburos aromáticos polihalogenados (HAPs) (de Verneuil *et al.* 1983a; Kawanishi *et al.* 1983; Ríos de Molina *et al.* 1987; Billi de Catabbi *et al.* 1991; Chauhan *et al.* 2001). La disminución de su actividad y desordenes a nivel del gen de la UroD, que llevan a la acumulación de uroporfirina III (Uro III) y de sus precursores (ALA y PBG), caracterizan a la enfermedad Porfiria Cutánea Tarda (Elder 1998) y a un desorden análogo en plantas, conocido como fitoporfiria (Hu *et al.* 1998; Taylor 1998). Por todos estos motivos, la UroD ha sido ampliamente investigada en humanos y en distintos organismos de experimentación.

La UroD ha sido purificada a homogeneidad a partir de: la bacteria *Rhodobacter sphaeroides* (Jones y Jordan 1993), hígado bovino (Straka y Kushner 1983), eritrocitos de pollo (Kawanishi *et al.* 1983), eritrocitos humanos (Elder *et al.* 1983; Mukerji y Pimstone 1992) y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Felix y Brouillet 1990). Se han estudiado algunas de sus propiedades en bacterias (Koopmann *et al.* 1986; Jones y Jordan 1993), en levaduras (Felix y Brouillet 1990), en aves (Tomio *et al.* 1970), en mamíferos (Phillips *et al.* 1997; Ríos de Molina *et al.* 1999), en plantas de tabaco (Chen y Miller 1974) y en la Euglenophyta

Euglena gracilis (Juknat *et al.* 1989). Recientemente, se ha reportado la estructura cristalina de una recombinante humana (Withby *et al.* 1998) y de la UroD de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*; Martins *et al.* 2001), encontrando que se trataría de un barril ($\beta\alpha$)₈ con una hendidura profunda que corresponde al sitio activo y que está formada por los lazos presentes en los extremos C terminales de las cadenas del barril. Además, ya se conoce la secuencia de nucleótidos que codifican para la UroD del hombre (Romeo *et al.* 1986), de la rata (Romana *et al.* 1987), de la Cyanophyta *Synechococcus* sp. (Kiel *et al.* 1990), de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Garey *et al.* 1992) y de las bacterias *Bacillus subtilis* (Hansson y Hederstedt 1992) y *Escherichia coli* (Nishimura *et al.* 1993). Los trabajos llevados a cabo hasta principios de la década del 90 indicaban que, en la mayoría de los organismos estudiados, la UroD presentaría una forma monomérica de ca. 40 kDa de masa molecular (Felix y Brouillet 1990; Jones y Jordan 1993). Sin embargo, Kawanishi *et al.* (1983) y Seki *et al.* (1986) propusieron una estructura dimérica para la UroD de pollo y, posteriormente, también se postuló una conformación similar en humanos (Phillips *et al.* 1997; Whitby *et al.* 1998) y en *Nicotiana tabacum* (Martins *et al.* 2001). Martins *et al.* (*op. cit.*), del análisis conjunto con los resultados obtenidos por otros investigadores, han propuesto que la formación de un dímero sería una propiedad común en la familia de las proteínas UroD. Esta teoría está sustentada por la ausencia de mutantes naturales para los residuos localizados en la interfase del dímero, por el grado relativamente alto de conservación de los aminoácidos de las regiones de la proteína que intervienen en la dimerización, por la asociación de su actividad con una masa molecular correspondiente al dímero, por la presencia de dímeros similares en la estructura cristalina de la UroD de tabaco y de la UroD humana y por cálculos de modelado molecular.

Por otra parte, dentro de las algas, se ha demostrado la conversión de ALA o PBG a porfirinas en extractos libres de células (Bogorad 1958; Carell y Kahn 1964) y se han descripto algunas de las propiedades fundamentales de la UroD parcialmente purificada de *Euglena gracilis* (Euglenophyta) (Juknat *et al.* 1989). También se ha demostrado que preparaciones de *Chlorella* (Chlorophyta) pueden catalizar la síntesis de coproporfirina III y Proto IX desde Urogen III (Bogorad 1958). Si bien se han utilizado cepas mutantes de este género para estudiar la síntesis de clorofila, estos estudios se han centrado principalmente en los intermediarios que llevan a la formación de esta última desde Proto IX (Granick 1971; Allen 1971). Hasta la fecha, no se han realizado estudios específicos sobre la UroD en el género

Chlorella ni en ninguna otra Chlorophyta, existiendo como único antecedente de la UroD de algas, el trabajo realizado en *Euglena gracilis* por Juknat *et al.* (1989).

El género *Chlorella* constituye una de las microalgas más ampliamente distribuidas en la naturaleza y las especies de ese género forman parte del fitoplancton en todo tipo de ambientes acuáticos. Los estudios sobre la biosíntesis de compuestos tetrapirrólicos en microalgas tienen una importancia primordial, ya que la clorofila del fitoplancton es la responsable de captar la energía lumínica y convertirla en energía química, determinando la capacidad de desarrollo de las microalgas fitoplanctónicas y proveyendo compuestos de carbono reducido, al resto de los organismos del ecosistema acuático. Por otro lado, se sabe que diversos xenobióticos, como los HAPs, ingresan en los ecosistemas acuáticos desde diferentes fuentes (por ej. pesticidas y residuos de la actividad de industrias químicas) y pueden persistir en ellos por varios años (Gómez-Catalán *et al.* 1993; Muñoz *et al.* 1996). Estos compuestos tienen efectos carcinogénicos y mutagénicos, por lo tanto se los considera contaminantes ambientales altamente dañinos o riesgosos (Semple *et al.* 1999). Las microalgas unicelulares, por ser sensibles a los xenobióticos, por poseer un ciclo de vida relativamente corto y por ser fácilmente manipulables en cultivos de laboratorio, han sido usadas en la determinación de la toxicidad de este tipo de sustancias (Caux *et al.* 1996). Se ha informado que la bioacumulación de HAPs en ellas es muy rápida, cumpliendo un papel principal en la persistencia y entrada de estos xenobióticos en la cadena alimentaria del ecosistema acuático (Muñoz *et al.* 1996). Sabiendo que la UroD es inhibida *in vivo* por HAPs, la puesta a punto de la determinación de su actividad en *Chlorella kessleri* permitiría disponer de una nueva herramienta para detectar este tipo de contaminantes ambientales.

Otro aspecto interesante, de las microalgas en general y del género *Chlorella* en particular, es el potencial valor biotecnológico, que día a día se pone más de manifiesto. En los últimos años han recobrado renovado impulso en el mundo las investigaciones relacionadas con el uso de cultivos de microalgas en Biología Aplicada. Los principales esfuerzos se han dirigido a su utilización como fuente de alimento, como biofertilizante, para el tratamiento de efluentes cloacales y residuos industriales y para la obtención de nuevos fármacos, vitaminas, pigmentos, antibióticos, etc. (Borowitzka y Borowitzka 1988; Borowitzka 1995; Apt y Behrens 1999). La síntesis y la excreción de metabolitos en las algas dependen del balance entre la producción y la utilización de sus productos fotosintéticos (Borowitzka y Borowitzka 1988), por lo que la regulación de la síntesis de la clorofila estaría involucrada en dicho

balance. El estudio y los conocimientos sobre este camino pueden ayudar a la comprensión y al manejo de la producción de determinados metabolitos de interés industrial, que normalmente son excretados al medio y, algunos de los cuales, han mostrado poseer actividad biológica (Borowitzka 1995; Juárez y Accorinti 1995; Apt y Behrens 1999).

- Teniendo en cuenta que los principales pasos regulatorios del camino biosintético del hemo y de las clorofilas se encuentran en el comienzo del camino (síntesis de ALA) y en el punto previo a su ramificación que es catalizado por la UroD (donde tendría lugar el control de metabolitos para regular el rendimiento y permitir la coordinación con la síntesis de apoproteínas) (Grimm 1998), se estableció como objetivo de esta parte del trabajo de tesis, estudiar dichos puntos claves en *Chlorella kessleri*. En el presente capítulo, se exponen los trabajos realizados para llevar a cabo el aislamiento y la purificación parcial de la UroD de la cepa BAFC CA10 de *Chlorella kessleri* (Trebouxiphyceae, Chlorophyta), aislada de la Laguna Verde (Copahue, Neuquén, Argentina). Además, se describen por primera vez algunas de las propiedades básicas y las condiciones óptimas para realizar los ensayos de actividad de esta enzima. Por otra parte, se presentan los resultados de los estudios comparativos sobre las distintas vías que podrían llevar a la síntesis del primer metabolito, el ALA. Para ello, se llevaron a cabo las determinaciones de actividad ALAS y DOVAT en extractos crudos obtenidos de la misma cepa.

II. 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Los estudios desarrollados en este capítulo, fueron realizados con la cepa axénica BAFC CA10 de *Chlorella kessleri* Fott y Nováková (Trebouxioophyceae, Chlorophyta), aislada de la Laguna Verde, Complejo Termal Copahue (Neuquén, Argentina), según lo especificado en Materiales y Métodos del Capítulo I.

II. 2. 1. Caracterización del crecimiento de *C. kessleri* en cultivo

Dado que la realización de estudios enzimáticos requiere trabajar con una biomasa considerablemente alta, se estudió el crecimiento de *C. kessleri* en cultivos en lote en medio BBM con y sin el agregado de fuente orgánica de carbono. Para ello, se establecieron cultivos axénicos líquidos en 1.000 ml de medio BBM y en 1.000 ml de medio BBM glucosa (Materiales y Métodos, Cap. I) y se mantuvieron en un agitador orbital (210 rpm) a 23° C ($\pm 1^\circ$ C) bajo luz continua (80 $\mu\text{mol fotones. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$) (condiciones estándares). Los cultivos se iniciaron sembrando 10 ml de un precultivo en BBM líquido que creció durante 2 semanas bajo condiciones estándares y se estimó su crecimiento a lo largo de 37 días o más, tomando alícuotas de 1 ml de cada cultivo en condiciones de esterilidad, previa homogeneización por agitación. El aumento de biomasa se estimó midiendo la densidad óptica de una alícuota bien homogeneizada del cultivo, en un espectrofotómetro Shimadzu UV/vis a 600 nm, contra un blanco de agua destilada, y mediante recuento celular en cámara de Neubauer (Přibil y Marvan 1979; Booth 1995). Se contaron tantas alícuotas como fuera necesario como para que el error de recuento ($\epsilon = [S \cdot (n^{1/2} \cdot x)^{-1}] \cdot t_{(n-1; 1-\alpha)}$) resultara menor al 10%. Además, periódicamente se hicieron controles de axenicidad, de acuerdo a lo especificado en Materiales y Métodos del capítulo I. Los parámetros estimados se utilizaron para graficar la densidad óptica a 600 nm vs. tiempo y el log. N° células/ml vs. tiempo. Además, se estimó la tasa de crecimiento como $\mu = (\ln N_f - \ln N_i)/\text{día}$ (donde N_f = Número final de células y N_i = número inicial de células), y se graficó su variación en función del tiempo.

II. 2. 2. Extractos enzimáticos

Se realizaron cultivos líquidos en erlenmeyers conteniendo 1.000 ml de medio BBM glucosa (Materiales y Métodos, Cap. I) y se mantuvieron en un agitador orbital (210 rpm) a 23° C ($\pm 1^\circ$ C) y bajo luz continua (80 $\mu\text{mol fotones. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$). Antes de la cosecha para la preparación de los extractos enzimáticos, se tomaron alícuotas de los cultivos, para estimar su biomasa por determinación del contenido de clorofila, peso seco y recuento celular en cámara de

Neubauer. El contenido de clorofila *a* fue calculado por análisis espectrofotométricos de extractos en acetona 90 % (v/v), de acuerdo al método de Marker *et al.* (1980).

En la Figura 4 se esquematiza la marcha general de obtención de los extractos enzimáticos, a partir de los cultivos algales. Las células se cosecharon por centrifugación a 5.000 x g durante 20 minutos a los 5, 15 y/o 25 días de crecimiento (fase de crecimiento exponencial, exponencial tardía y estacionaria, respectivamente). Luego, se lavaron 2 veces con buffer fosfato de potasio 0,134 M pH 6,5 (cuando se utilizarían para estudios de UroD o ALAS) o con buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,4 (cuando se utilizarían en los estudios de DOVAT). Se resuspendieron en el mínimo volumen del mismo buffer y se sonicaron durante 160 segundos totales, usando un homogeinizador ultrasónico Cole Parmer CP600 4710. El procedimiento se realizó aplicando ultrasonido en intervalos de 20 segundos, alternando con igual período de enfriamiento en hielo, para evitar el calentamiento y la desnaturalización de las proteínas. La efectividad del método se controló mediante observaciones con microscopio óptico y en todos los casos resultó entre un 60 % y 70 % de eficiencia. Este “homogenato celular crudo” se utilizó, inmediatamente después de preparado, como fuente enzimática para los ensayos de actividad ALAS, o se centrifugó por 20 minutos a 11.000 x g para separar los restos celulares y las células intactas. El sobrenadante obtenido se suplementó con inhibidores de proteasas (ditriotreitol 1 μ M, benzamidina 0,2 mM y fluoruro de fenilmetil sulfonilo 0,5 mM) y luego se usó como extracto enzimático (“sobrenadante de homogenato”) para los ensayos de actividad DOVAT y UroD. Todos los procedimientos se realizaron a 4° C.

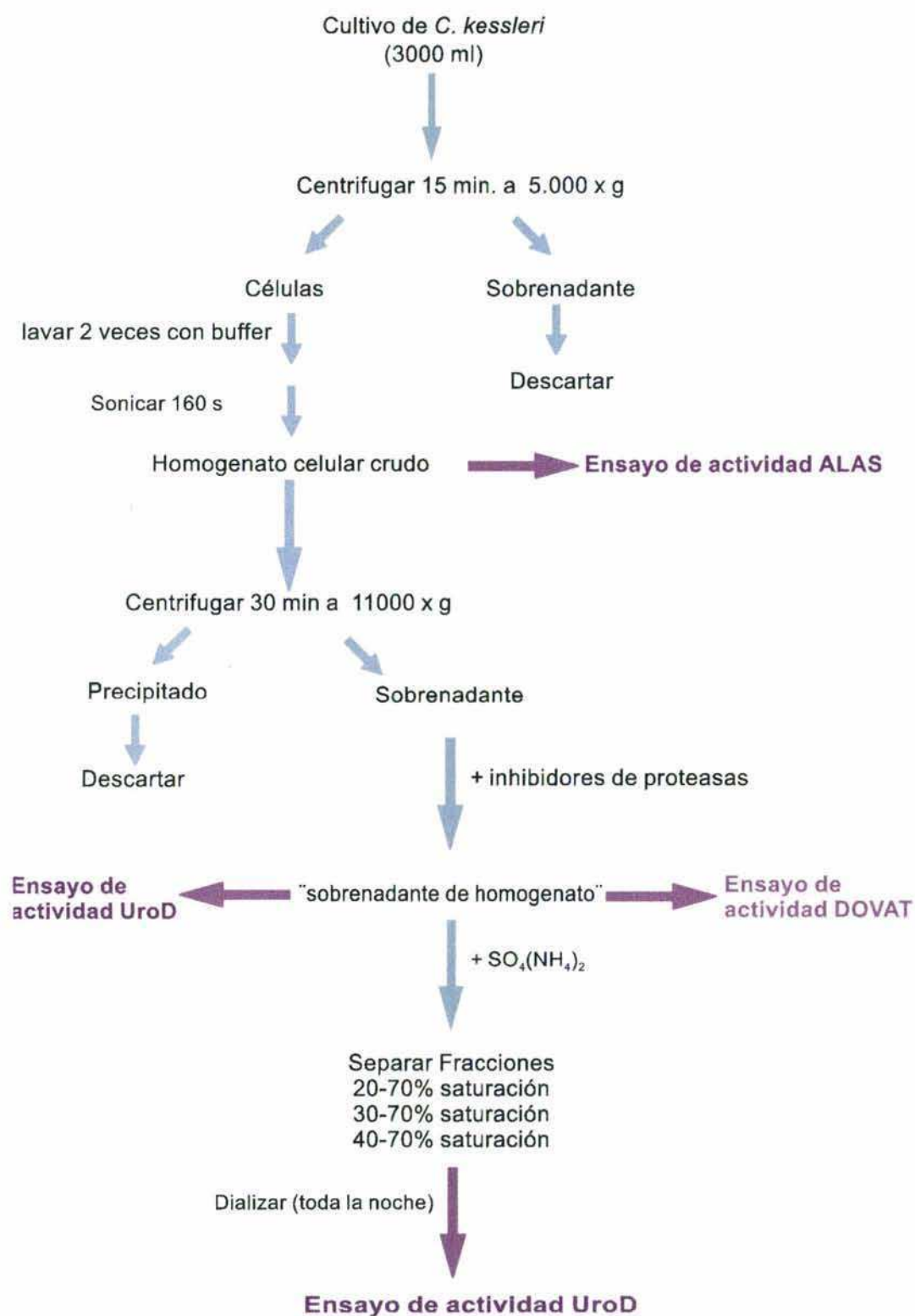


Figura 4. Marcha general de preparación de los extractos enzimáticos.

II. 2. 3. Estudios sobre la UroD

II. 2. 3. 1. Separación y cuantificación de las porfirinas metil-éster por HPLC

La separación de las distintas porfirinas, se realizó aplicando la técnica de cromatografía líquida de alta resolución. Para ello se utilizó un HPLC de Waters Associates, con detector de absorbancia a 405 nm, equipado con una columna μ Porasil (30 x 0,4 cm). Como solvente de elución se usó una mezcla de acetato de etilo: n-heptano (50: 50, v/v), a un flujo de 1,5 ml/min., a 700 psi. Las metil-porfirinas se cuantificaron en base a las áreas que quedan por debajo de los picos correspondientes, utilizando los coeficientes determinados por Billi de Cattabbi *et al.* (1991).

II. 2. 3. 2. Ensayos de actividad UroD

El sustrato (Urogen III) se preparó por reducción de Uro III (Porphyrins Products) de acuerdo al método de Mauzerall y Granick (1958). Brevemente: la Uro III se disolvió en NaOH 25 mM y se colocó en un tubo con tapa esmerilada. La reducción se llevó a cabo durante 2 - 3 minutos en oscuridad, bajo luz roja, agregando amalgama de sodio¹ al 3 % en una proporción de 1 g/ml. Dentro de ese período, la solución se tornó incolora y, para asegurar la reducción completa de la Uro III a Urogen III, se continuó con la reacción por 2 - 3 minutos más. La solución obtenida se filtró inmediatamente a través de una placa filtrante y se ajustó su pH a 6,5 - 6,7 con H₃PO₄ al 40 % (p/v). Estos últimos pasos se realizaron bajo una corriente de nitrógeno gaseoso, para mantener el medio anaerobio.

La mezcla estándar de incubación contenía (salvo indicación), en un volumen final de 1 ml: la muestra enzimática ("sobrenadante de homogenato" o fracciones precipitadas con sulfato de amonio resuspendidas en buffer y dializadas), Urogen III 0-5 μ M, GSH 1 mM y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,1 mM, en buffer fosfato 0,067 M pH 6,5 (salvo indicación). Las incubaciones se llevaron a cabo en oscuridad y en anaerobiosis, en tubos de Thunberg, con agitación mecánica, a 37° C por 20 minutos (salvo indicación). En todos los casos se realizaron blancos a tiempo cero y blancos con Urogen III y sin enzima. La reacción se detuvo con HCl concentrado hasta una concentración final de 5 % (p/v).

¹ La amalgama de sodio se preparó calentando aproximadamente 30 g de mercurio a 30-40°C, en una cápsula de porcelana. En la masa fundida se introdujo 1 g de sodio en trozos, previamente secados en papel de filtro. Luego se dejó enfriar y la mezcla endurecida se trituró en trozos medianos y se guardó en un frasco cerrado, en desecador.

Una vez precipitadas las proteínas, los productos de decarboxilación formados durante la reacción y el sustrato remanente se oxidaron a sus respectivas porfirinas por exposición a la luz y al aire. Los extractos conteniendo los productos oxidados, se filtraron y se secaron en desecador al vacío (en presencia de CaCl_2 y NaOH) a temperatura ambiente y en oscuridad. Las porfirinas secas se esterificaron con $\text{MeOH} : \text{H}_2\text{SO}_4$ (19 : 1, v/v) por 24 hs en oscuridad, a temperatura ambiente, y luego se extrajeron con cloroformo, se concentraron a baño María a presión reducida y se almacenaron en oscuridad, a temperatura ambiente, hasta su separación y cuantificación por HPLC, según lo especificado en el ítem II. 2. 3. 1.

La actividad UroD se expresó como nmol de Urogen III decarboxilado/mg proteínas/h (primera etapa) o como nmol de Coprogen III producido/mg proteínas/h (segunda etapa).

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (1976), usando seroalbúmina bovina como estándar.

Todos los experimentos se repitieron al menos tres veces por duplicado y los resultados se expresaron como la media \pm DS.

II. 2. 3. 3. Actividad UroD en función del estado de crecimiento de los cultivos

Se realizó un estudio de la actividad UroD de extractos enzimáticos crudos, obtenidos de células en distintas etapas de crecimiento. Estos ensayos fueron realizados como se describe en el punto II. 2. 3. 2., utilizando como fuente enzimática, el “sobrenadante de homogenato” obtenido de células provenientes del mismo cultivo y cosechadas a los 5, 15 y 25 días posteriores a la inoculación.

II. 2. 3. 4. Purificación parcial de la UroD

Todos los procedimientos se realizaron a 4° C. El “sobrenadante de homogenato” obtenido de células en fase exponencial de crecimiento, fue sometido a una precipitación fraccionada entre 20-70 %, 30-70 % y 40-70 % de saturación con sulfato de amonio (SSA). Las fracciones precipitadas se separaron por centrifugación a 10.000 x g durante 30 minutos y los precipitados resultantes se almacenaron a -20° C hasta su uso. Cada fracción se disolvió en un mínimo volumen de buffer fosfato de potasio 0,005 M (pH 6,5), se dializó durante toda la noche contra el mismo buffer, a 4° C, a través de una membrana de diálisis P-10 y se utilizó como fuente enzimática para los ensayos de actividad UroD.

II. 2. 3. 5. *Efecto de las condiciones de ensayo y del almacenamiento sobre la actividad UroD*

Para encontrar las condiciones óptimas para la determinación de la actividad UroD en *C. kessleri*, se llevaron a cabo estudios utilizando como muestra enzimática la fracción 30-70 % SSA. Se estudió la actividad en función de: la concentración de proteínas (0 - 1 mg/ml), la concentración de sustrato (0 - 5 μ M), el pH (5,5 - 7,2), el tiempo (0 - 30 minutos) y la temperatura de incubación (0 - 65° C).

Para probar la estabilidad de las preparaciones enzimáticas, se midió la actividad de la fracción 30-70 % SSA a los 14 días y a los 2 meses de almacenamiento a -20° C.

II. 2. 3. 6. *Energía de activación de la reacción catalizada por la UroD*

Para calcular la energía de activación (E), se graficó el log v_i (nmol Urogen III decarboxilado/ mg proteínas/ h) en función de la inversa de las temperaturas absolutas (entre 8° C y 45° C, donde v_i presentó una relación lineal con la temperatura, $r^2 = 0.9934$) y se aplicó la ecuación de Arrhenius (Wilkinson 1980):

$$\text{Log } v_i = C - \frac{E_{(J/mol)}}{2,303 \cdot R_{(J/mol.K^\circ)}} \cdot \frac{1}{T(^{\circ}K)}$$

Donde R = 8,315 J/mol.°K, T= temperatura absoluta (°K), E= energía de activación (J/mol)

Calculando la pendiente que se obtiene del gráfico de Arrhenius para las temperaturas entre 8° C y 45° C y, despejando de la fórmula anterior, se obtiene que:

$$E_{(J/mol)} = - 19,149 \text{ pend}_{(8^{\circ}\text{C}-45^{\circ}\text{C})}$$

II. 2. 3. 7. *Inmunodetección (Western Blot)*

Para poder detectar la proteína UroD en los extractos enzimáticos de *C. kessleri*, se aplicó la técnica de inmunodetección, como se describe a continuación:

El “sobrenadante de homogenato” y los precipitados 30-70 % y 40-70 % SSA (previamente dializados), fueron sujetos a electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS/PAGE). Las proteínas se transfirieron electroforéticamente desde el gel a una membrana de nitrocelulosa, mediante el empleo de una celda Bio-RAD con ánodo de titanio recubierto de platino, para transferencias semi-húmedas, en buffer Tris-glicina² pH 9,2. La transferencia se llevó a cabo durante 1 h, a un voltaje constante de 15 V y una corriente límite de 5,5 mA/cm². Una vez finalizada la transferencia, se bloquearon los sitios inespecíficos por tratamiento con leche descremada 5 % (p/v), en buffer TTBS³ 100 mM (pH 7,5) durante toda la noche a 4° C. Luego se incubó la membrana durante dos horas y media con el primer anticuerpo anti - UroD de hígado de rata (generosamente cedido por la Lic. Gabriela Chaufan), en buffer TTBS, con agitación. A continuación, se realizaron una serie de 5 lavados con buffer TTBS y luego se incubó la membrana, durante una hora con agitación, con una solución en TTBS del segundo anticuerpo IgG anti-conejo conjugado con biotina (1: 1000) (Sigma). Se repitieron los lavados con buffer TTBS y se volvió a incubar por una hora con el complejo ExtrAvidina conjugada a peroxidasa (Sigma). Luego se reveló con diaminobenzidina (DAB), sustrato de peroxidasa (Sigma FastTM). Finalmente, se lavó con agua destilada, para detener la reacción.

La electroforesis se realizó según la técnica descripta por Schägger y von Jagow (1987) para proteínas de bajo peso molecular. Las proteínas se separaron sobre minigeles (7 cm x 8 cm x 0,75 mm), usando poliacrilamida 4 % para el gel concentrador y 10 % para el gel de corrida. Las muestras sembradas (conteniendo 30 µg de proteínas), se trataron previamente con un volumen igual de “buffer de tratamiento de la muestra”⁴ y se calentaron a baño María por 3 minutos. Las corridas se realizaron a un voltaje de 80 V durante el pasaje de la muestra por el gel concentrador (20 minutos) y de 100 V para la separación posterior (1 hora). Las proteínas se revelaron con Azul brillante de Coomassie R250 (Sigma) 0,4 % (p/v) en metanol-ácido acético-agua (30: 10: 60).

² buffer Tris-glicina: 3,3 g Tris, 14,4 g glicina, llevar a 800 ml con agua bidestilada y agregar 200 ml de metanol.

³ buffer TTBS 100 mM: Tris-HCl 100 mM, NaCl 0,9 %, Tween 20 0,1 %.

⁴ “buffer de tratamiento de la muestra”: Tris-HCl 0,125 M, glicerol 20 % (v/v), SDS 4 % (p/v), β-mercaptoetanol 10 % (v/v), azul de bromofenol 0,01 % (p/v).

Para poder estimar el peso molecular de las proteínas inmunorreactivas, en cada gel se corrió, paralelamente, el kit “BenchMark Prestained Protein Ladder” (Gibco) conteniendo marcadores de PM preteñidos de 9, 14, 20, 25, 38, 51, 62, 84, 116 y 184 kDa. Los pesos moleculares se determinaron mediante una curva de calibración, obtenida al graficar el log del PM de las proteínas marcadoras en función de sus Rf (distancia recorrida por la muestra/distancia recorrida por el frente).

II. 2. 4. Estudios sobre la síntesis de ALA

Para determinar la ruta de síntesis de ALA que opera en *C. kessleri*, se llevaron a cabo ensayos de detección de la actividad ALAS en “homogenato celular crudo” y de DOVAT en “sobrenadante de homogenato”, obtenidos a partir de células en la fase exponencial de crecimiento.

II. 2. 4. 1. Ensayos de la actividad ALAS

Ensayos preliminares incubando “homogenatos celulares crudos”, conteniendo menos de 1 mg proteínas, en presencia de glicina con y sin sistema generador de Succinil CoA, dieron resultados de detección de actividad dudosos. Se procedió, entonces, a realizar los ensayos aumentando la cantidad de proteínas incubadas y sin sistema generador de Succinil CoA, presuponiendo que el homogenato contenía todo el sistema necesario para la síntesis de Succinil CoA y de ALA (Mauzerall y Granick 1956).

La mezcla estándar de incubación contenía, en un volumen final de 2 ml: 0,5 ml de la muestra enzimática (“homogenato celular crudo”), glicina 100 mM y EDTA 10 mM, en buffer Tris 0,08 M (pH 7,2). Las incubaciones se llevaron a cabo por 1 h, a 37° C, con agitación. En todos los casos se realizaron controles a tiempo cero (para restar el contenido de ALA endógeno). La reacción se detuvo agregando ácido tricloroacético hasta una concentración final de 5 % (p/v), para producir la precipitación de las proteínas. Las muestras desproteinizadas se mantuvieron en hielo por 30 minutos, se centrifugaron a 5.000 x g durante 10 minutos y se cuantificó, en el sobrenadante, el ALA formado.

La actividad ALAS se expresó como nmol de ALA producido/mg proteínas/h. El ensayo se repitió dos veces por duplicado y el resultado se expresó como la media \pm DS.

II. 2. 4. 2. Cuantificación del ALA formado

El producto de reacción (ALA) se midió espectrofotométricamente de acuerdo con la técnica de Mauzerall y Granick (1956). Para ello, 1 ml del sobrenadante (de los incubados y de los controles a tiempo cero, ajustados a pH 4,6 con NaOH 3N), se combinaron con 1 ml de buffer acetato de sodio 1 M pH 4,6, más 50 µl de acetilacetona. Después de mezclar, las muestras se calentaron a 100° C por 10 minutos y luego se dejaron enfriar a temperatura ambiente. La solución resultante, se combinó con un volumen igual de reactivo de Ehrlich modificado⁵ y a los 10 minutos se leyó la absorbancia a 554 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV/vis. Para determinar la absorbancia neta, se restó la absorbancia de los controles a tiempo cero de la absorbancia de los incubados y el ALA se cuantificó de acuerdo con la siguiente ecuación.

$$\text{nmoles ALA/ ml} = \frac{A_{554} \text{ neta} \times V_s \times \text{dilución} \times 10^6}{6,1 \times 10^4 \times V_m}$$

Donde V_s es el volumen del sobrenadante; V_m el volumen incubado de la muestra enzimática y $6,1 \times 10^4$ el coeficiente de extinción molar.

II. 2. 4. 3. Ensayos de actividad DOVAT

Los ensayos se realizaron de acuerdo al método descrito por Lombardo *et al.* (1988), con ligeras modificaciones. La mezcla estándar de incubación contenía, en un volumen final de 1 ml: 0,6 ml de la muestra enzimática ("sobrenadante de homogenato"), DOVA 3 mM y alanina 166,7 mM o ácido glutámico 166,7 mM, en buffer fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,4. Las incubaciones se llevaron a cabo a 37° C, durante 1 h con agitación. En todos los casos, se realizaron blancos con enzima y sin sustratos (DOVA, ácido glutámico, alanina). La reacción se detuvo agregando ácido tricloroacético hasta una concentración final de 5 % (p/v), para producir la precipitación de las proteínas. Las muestras se mantuvieron en hielo por 30 minutos, se centrifugaron a 5.000 x g durante 10 minutos y se procedió a cuantificar el ALA formado, de acuerdo a lo especificado en el ítem II. 2. 4. 2. (tomando como absorbancia neta la absorbancia de los incubados menos la del blanco correspondiente).

⁵ Reactivo de Ehrlich modificado: 1 g de p-dimetilaminobenzaldehído se disuelve en 30 ml de ácido acético glacial. Luego se le agregan 8 ml de ácido perclórico 70 % (v/v) y se completa a 50 ml con ácido acético glacial (Mauzerall y Granick 1956).

La actividad DOVAT se expresó como nmol de ALA producido/mg proteínas/h. El ensayo se realizó por duplicado y el resultado se expresó como la media \pm DS.

II. 3. RESULTADOS

II. 3. 1. Caracterización del crecimiento de *C. kessleri* en cultivo

El crecimiento de *Chlorella kessleri* en función del tiempo, en medio BBM glucosa, se muestra en la Figura 5. Del primero al quinto o sexto día se observa una fase de crecimiento exponencial, caracterizada por una tasa de crecimiento (μ) que se mantiene en valores más o menos constantes (Figura 6). A partir del séptimo día y hasta aproximadamente el día 16, se registra una disminución constante de la tasa de crecimiento, correspondiente a la última parte de la fase exponencial de crecimiento (fase exponencial tardía). A partir de ese momento, salvo pequeñas fluctuaciones, puede considerarse que se ha llegado a la fase estacionaria de crecimiento, donde μ tiende a 0.

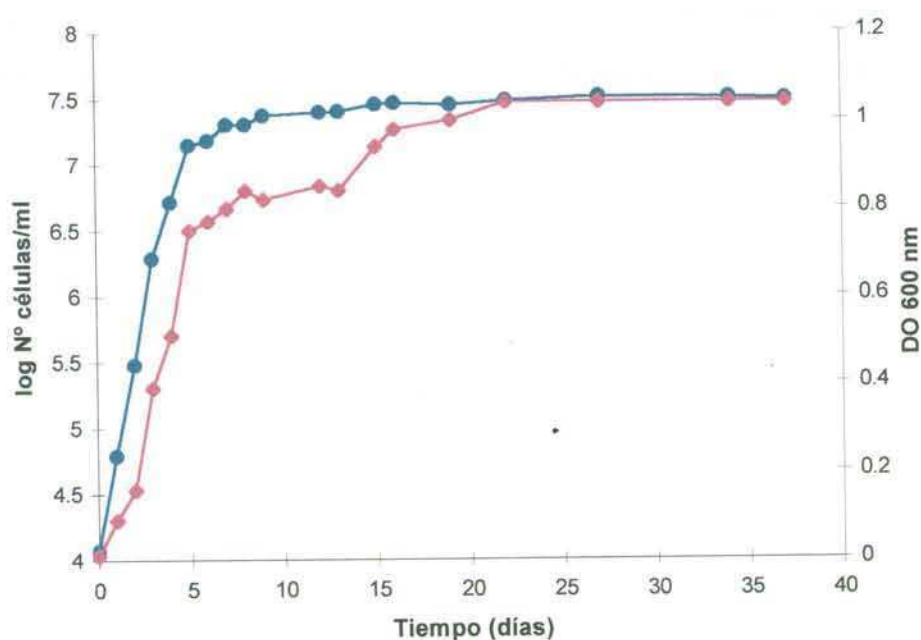


Figura 5. Crecimiento de *Chlorella kessleri* en función del tiempo, en medio BBM glucosa. (—●—): log N° células/ml. (—♦—): DO 600 nm.

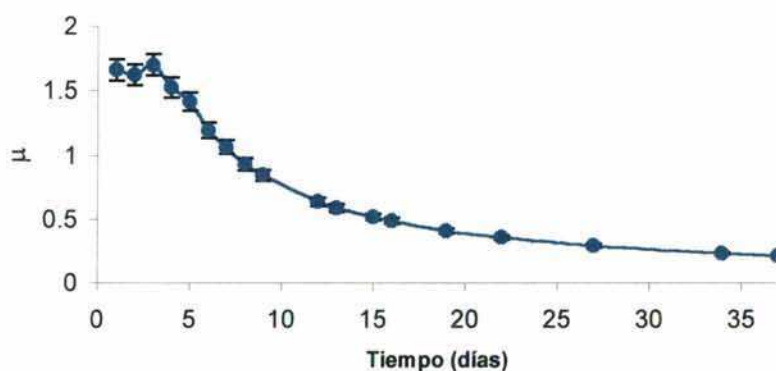


Figura 6. Variación de la tasa de crecimiento ($\mu = [\ln N_f - \ln N_i]/\text{día}$) en función del tiempo de cultivo. N_f = Número final de células. N_i = número inicial de células.

El crecimiento de *Chlorella kessleri* en el medio mineral sin el agregado de una fuente de carbono orgánica, fue mucho más lento que en el medio con agregado de glucosa (Figura 7). Si tomamos los resultados semanalmente, en este caso también puede delimitarse una fase de crecimiento exponencial hasta la segunda o tercer semana, seguida de una fase de crecimiento estacionaria. Además, la biomasa alcanzada en este medio de cultivo es aproximadamente un orden de magnitud menor que la alcanzada en BBM glucosa ($34,95 \times 10^5$ vs. $315,53 \times 10^5$ células/ml, a los 35 días).

En ninguno de los dos medios de cultivo se registró una fase lag o fase de espera, previa al inicio de la fase de crecimiento exponencial.

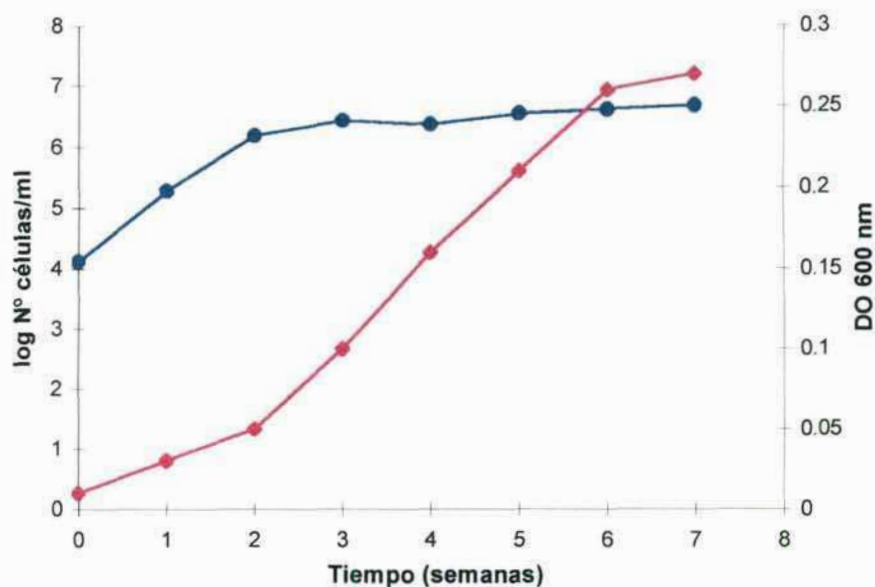


Figura 7. Crecimiento de *Chlorella kessleri* en función del tiempo, en medio BBM. (—●—): log N° células/ml. (—♦—): DO 600 nm.

II. 3. 2. Extractos enzimáticos

Dada la corta vida media de la enzima ALAS, informada para otros sistemas biológicos (Beale 1971; Dailey 1997), se decidió realizar su determinación sobre el homogenato total, minimizando así el tiempo de tratamiento de la muestra, desde la ruptura de las células hasta el momento de la incubación. Por otra parte, para determinar la actividad UroD y DOVAT se usó el sobrenadante de homogenato, dada la mayor estabilidad de estas enzimas y la mayor homogeneidad de las muestras, lo que aumentó la reproducibilidad de los resultados. En los tres casos se lograron resultados reproducibles y con una buena diferencia entre los valores de las determinaciones y los valores de sus correspondientes blancos.

II. 3. 3. Estudios sobre la UroD

II. 3. 3. 1. Separación de los productos de la actividad UroD y de la clorofila por HPLC

En primer lugar, se debió optimizar el método de separación por HPLC de los productos finales de la incubación de la UroD y de la clorofila endógena de las muestras enzimáticas. Esto se decidió debido a que, durante las primeras experiencias para determinar la actividad UroD de sobrenadantes de homogenatos, se comprobó que en los cromatogramas siempre aparecía una señal a tiempos de retención muy cortos (muy cercano al de Copro III), cuya intensidad no cambiaba con las distintas variables ensayadas. En estas primeras experiencias se utilizaba, como solvente de elución, una mezcla de acetato de etilo: n-heptano (40: 60, v/v). Teniendo en cuenta que los extractos enzimáticos tenían un alto contenido de clorofila y que ésta tiene un pico de absorción en la zona cercana al pico Soret de las porfirinas, era posible que la señal se debiera al contenido endógeno de este pigmento en la preparación enzimática. Se decidió, entonces, variar la relación entre los solventes de la mezcla de elución y aplicarla a la separación de los componentes de una mezcla estándar de Clorofila *a* (de *Anacystis nidulans*, de Sigma Co.) y Copro III (de Porphyrins Products). El solvente de elución se fue enriqueciendo en el componente más polar, hasta llegar a una relación 50: 50 (v/v), con la que se logró una buena separación de la Copro III y de la clorofila, con una diferencia de ~1,1 minutos entre sus tiempos de retención (Figura 8). Se procedió, entonces, a aplicar este solvente a la separación de los productos de decarboxilación producidos por el sobrenadante de homogenato y por las distintas fracciones precipitadas con sulfato de amonio. Los perfiles de HPLC de los productos provenientes de los incubados y de los blancos a tiempo cero, demostraron que, tanto el sobrenadante de homogenato como el precipitado 20-70 % SSA, contienen clorofila (Figuras 9 y 10) y que su pico se separa satisfactoriamente con el solvente empleado (Figura 10). Mientras que los perfiles de los productos de los incubados y de los blancos a tiempo cero, de los precipitados 30-70 % y 40-70 % SSA, no presentaron el pico correspondiente a la clorofila endógena (Figuras 11 y 12).

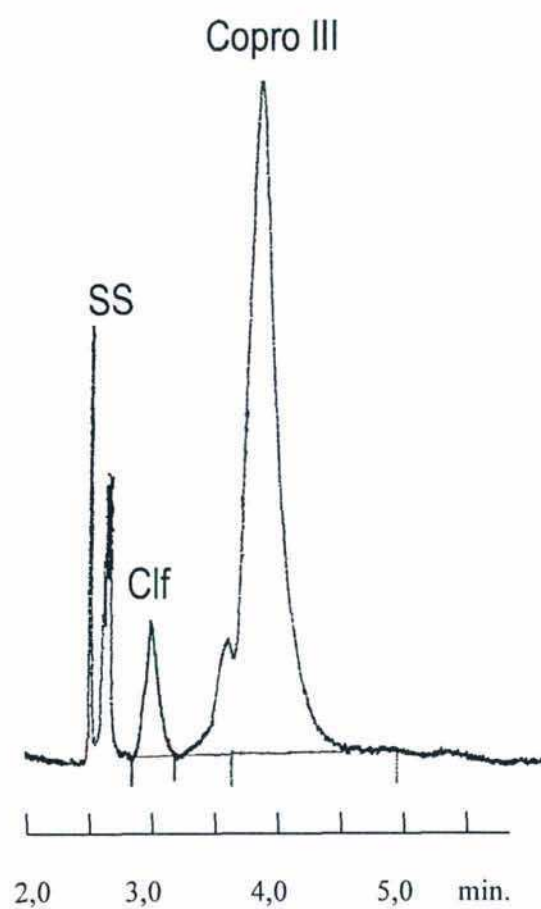


Figura 8. Perfil cromatográfico, obtenido por HPLC, de una mezcla de estándares de clorofila *a* (Clf) y coproporfirina III (Copro III), eluidas con *n*-heptano: acetato de etilo (1:1, v/v). SS, señal del solvente.

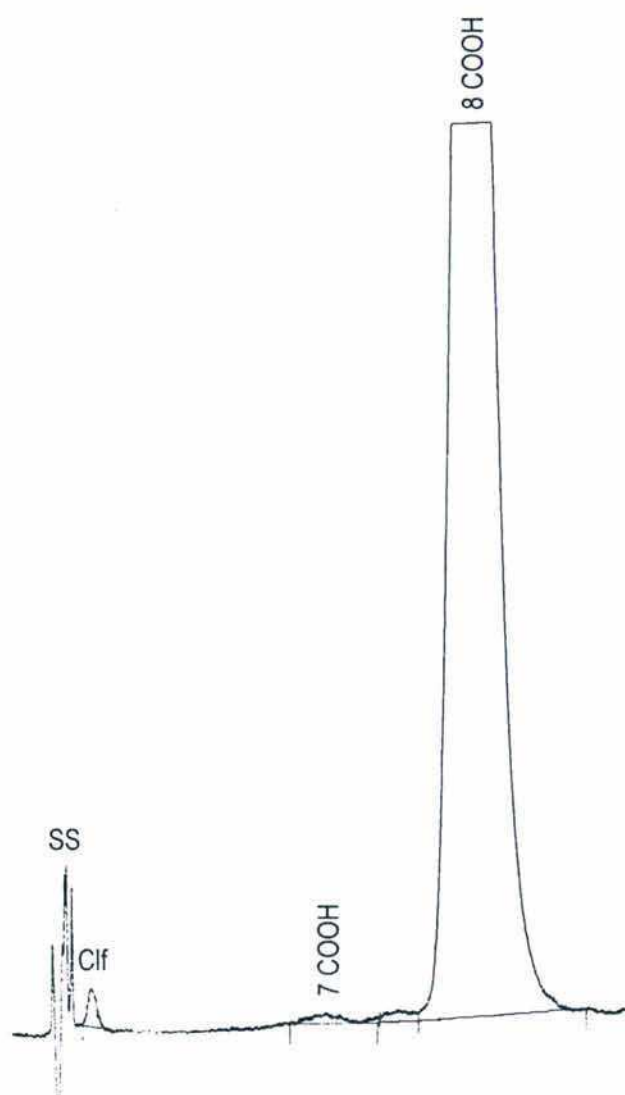


Figura 9. Perfil típico de separación por HPLC de las porfirinas presentes en los blancos a tiempo cero, del sobrenadante de homogenato y de la fracción 20 – 70 % SSA, eluyendo con n-heptano: acetato de etilo (1:1, v/v). Se observa una señal correspondiente al sustrato (8 COOH) y una señal correspondiente a la clorofila (Clf). SS, señal del solvente.

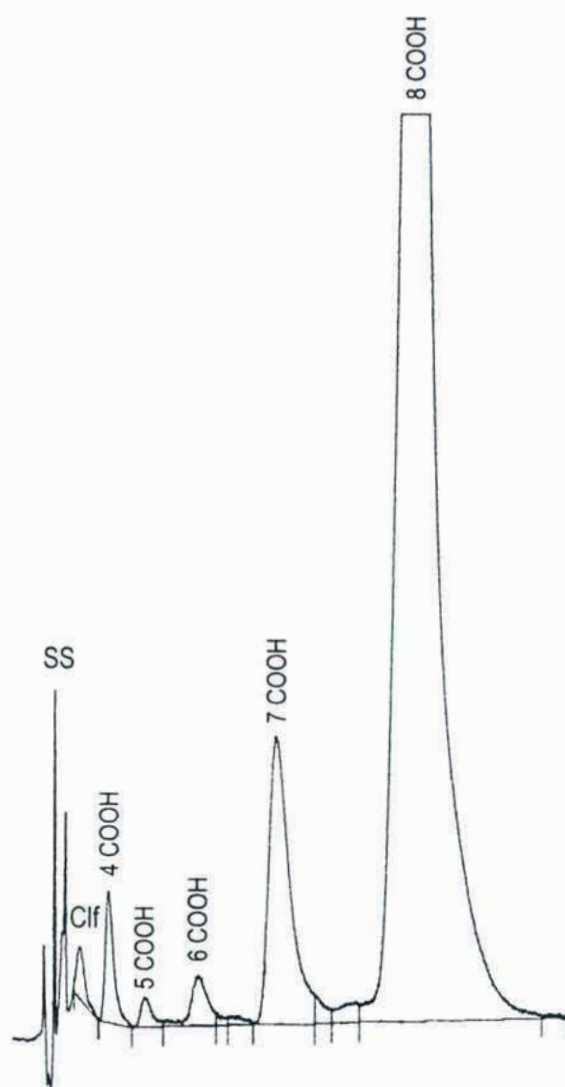


Figura 10. Perfil típico de separación por HPLC de los productos formados durante la incubación del sobrenadante de homogenato o de la fracción 20 – 70 % SSA, con Urogen III como sustrato. La incubación y la separación de las porfirinas se realizó como se detalla en Materiales y Métodos. La columna cromatográfica se eluyó con n-heptano: acetato de etilo (1:1, v/v). Además de las señales correspondientes al sustrato remanente (8 COOH), producto final (4 COOH) e intermediarios (7, 6 y 5 COOH), se observa la señal correspondiente a la clorofila (Clf). SS, señal del solvente.

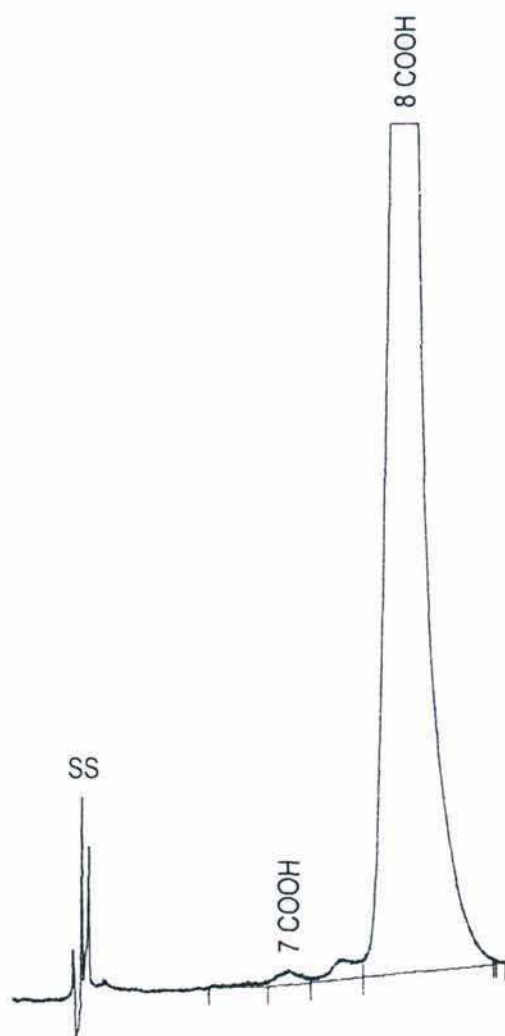


Figura 11. Perfil típico de separación por HPLC de las porfirinas presentes en los blancos a tiempo cero de las fracciones 30 – 70 % y 40 – 70 % SSA, eluyendo con n-heptano: acetato de etilo (1: 1, v/v). SS, señal del solvente.

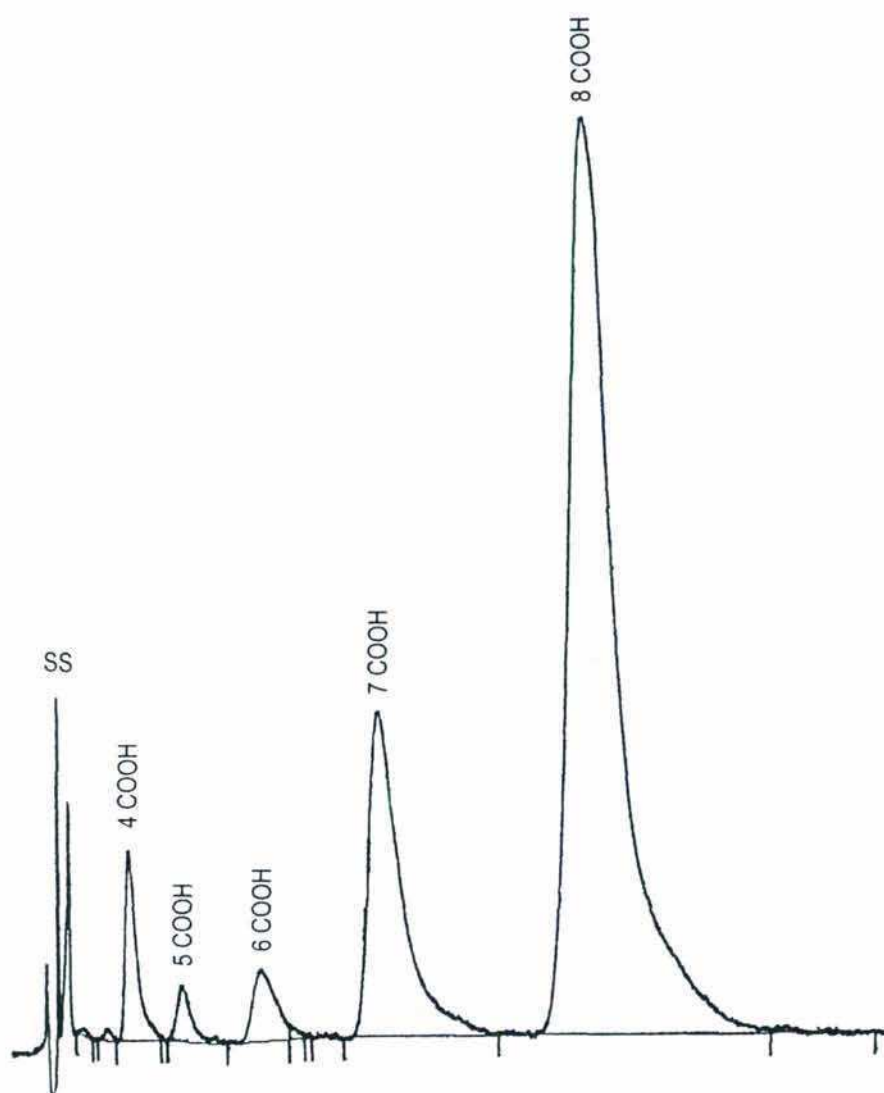


Figura 12. Perfil típico de separación por HPLC de los productos formados durante la incubación de la UroD de *C. kessleri* parcialmente purificada (fracciones 30 – 70 % y 40 – 70 % SSA), con Urogen III como sustrato. La incubación y la separación de las porfirinas se realizó como se detalla en Materiales y Métodos. La columna cromatográfica se eluyó con n-heptano: acetato de etilo (1: 1, v/v). 8 COOH, sustrato remanente; 4 COOH, producto final; 7, 6 y 5 COOH, intermediarios; SS, señal del solvente.

II. 3. 3. 2. *Ensayos de actividad UroD*

El análisis de los cromatogramas de los ensayos de la actividad UroD de *C. kessleri*, mostró que la decarboxilación del Urogen III procede a través de la formación de porfirinógenos intermediarios de 7, 6 y 5 COOH, con prevalencia de la heptacarboxiporfirina (Figura 12, 7 COOH).

II. 3. 3. 3. *Actividad UroD en función del estado de crecimiento de los cultivos*

Como se especificó en Materiales y Métodos (ítem II.2.3.3), para determinar la influencia de la etapa de desarrollo de *C. kessleri* en la actividad UroD, se realizó un estudio de la actividad de sobrenadantes de homogenato obtenidos de células en distintas fases de crecimiento.

Estos estudios mostraron que la actividad UroD alcanzó un pico en los cultivos de 5 días, que corresponden a la fase exponencial de crecimiento (30×10^6 cél./ml; 1,2 mg peso seco/ml y $9,4 \times 10^{-7}$ µg clorofila *a* por célula) (Figura 13, barra de la izquierda). A mayores tiempos de crecimiento, tanto en la fase exponencial tardía ($43,9 \times 10^6$ cél./ml; 3,9 mg peso seco/ml y $5,49 \times 10^{-7}$ µg clorofila *a* por célula) como en la fase estacionaria ($45,2 \times 10^6$ cél./ml; 5,5 mg peso seco/ml y $2,47 \times 10^{-7}$ µg clorofila *a* por célula), la actividad UroD disminuyó marcadamente (Figura 13, barra central y derecha, respectivamente). Además, la determinación del contenido de clorofila de los cultivos (µg clorofila *a* por célula) mostró una evolución paralela a la actividad UroD (Figura 13, datos entre paréntesis). Por estos dos motivos, se consideró adecuado llevar a cabo el aislamiento y el estudio de las características de la UroD de este organismo partiendo de cultivos en fase exponencial de crecimiento.

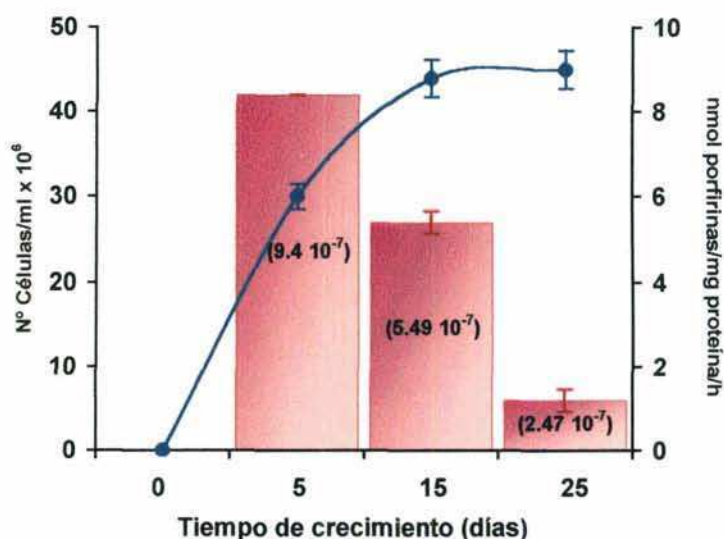


Figura 13. Actividad específica de la UroD de *Chlorella kessleri* en distintas fases de crecimiento. Los ensayos fueron realizados como se describe en Materiales y Métodos, usando sobrenadante de homogenato como fuente enzimática (0,25 mg proteínas/ml) y 7 μ M Urogen III como sustrato. La actividad específica de la primera etapa (barras) se expresa como la media \pm SD. —●— Crecimiento de *C. kessleri* como número de células/ml. Datos entre paréntesis, contenido de clorofila *a* por célula (μ g clorofila *a*/cél.).

II. 3. 3. 4. Purificación parcial

La Tabla 2 muestra los resultados de la purificación parcial de la UroD de *Chlorella kessleri*. La actividad específica de la primera etapa aumentó 1,64 veces y 1,9 veces, con una recuperación total de 48 % y 13 % en las fracciones 30-70 % y 40-70 % SSA, respectivamente. La actividad específica de la segunda etapa aumentó 1,72 veces y 2,00 veces con una recuperación total del 50 % y 14 % en las fracciones 30-70 % y 40-70 % SSA, respectivamente. También se ensayó el rango 20-70 % SSA (datos no mostrados), pero esta fracción mostró un grado de purificación menor que 1 con un rendimiento del 46 %. Por otro lado, la clorofila que coprecipitaba en esta fracción, interfería en la determinación de Copro III (producto final de la decarboxilación del Urogen III). Por lo tanto, el rango 20-70 % SSA se descartó de entrada, ya que se obtuvo una baja purificación y presentaba una evidente contaminación con clorofila, como se puede apreciar en el perfil de productos de la incubación de este precipitado (Figura 9 y Figura 10). En tanto que en los otros dos precipitados ensayados, la UroD se purificó aproximadamente 2 veces en comparación con el sobrenadante de homogenato inicial, mostrando valores de actividad específica similares (Tabla 2). Si bien el

grado de purificación de la fracción 40-70 % SSA fue levemente mayor al de la fracción 30-70 % SSA (2 vs. 1,7), el rendimiento fue mucho mayor en esta última (14 % vs. 50 %). Teniendo en cuenta estos resultados y los perfiles de productos de reacción de los incubados de estas fracciones (Figura 11 y Figura 12), se decidió utilizar la fracción 30-70 % SSA para las determinaciones de actividad enzimática, ya que esa fracción se encuentra libre de clorofila, su rendimiento es mucho mayor y permitió concentrar la muestra con respecto al sobrenadante de homogenato. Ensayos preliminares, utilizando como extracto enzimático el sobrenadante de homogenato sin precipitar, conteniendo menos de 0,1 mg proteínas/ml, no dieron actividad detectable y sólo después de la realización de este paso de concentración se logró incubar la cantidad de proteínas necesaria para detectar actividad UroD, bajo las condiciones de ensayo utilizadas.

Tabla 2. Purificación parcial de la UroD de *Chlorella kessleri*.

Fracción	Volumen (ml)	Primera etapa		Segunda etapa	
		Actividad específica (nmol/mg/h)	Rendimiento (%)	Actividad específica (nmol/mg/h)	Rendimiento (%)
Sobrenadante de homogenato	16,4	8,02 ± 1,2	100	1,75 ± 0,15	100
30 – 70 % SSA	2,4	13,18 ± 0,6	48	3,02 ± 0,1	50
40 – 70 % SSA	1,2	15,25 ± 1,5	13	3,52 ± 0,35	14

Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos. La actividad se midió incubando 0,2 mg proteínas/ml y 5 µM Urogen III como sustrato, y se expresa como nmol de Urogen III decarboxilado/mg proteínas/h (primera etapa) y como nmol de Coprogen III producido/mg proteínas/h (segunda etapa). SSA, saturación con sulfato de amonio.

II. 3. 3. 5. Efecto de las condiciones de ensayo y del almacenamiento sobre la actividad UroD

Para encontrar las condiciones óptimas de la determinación de la actividad UroD en *C. kessleri*, se estudió la actividad UroD en función de las siguientes variables, según se detalla en Materiales y Métodos (ítem II.2.3.5): concentración de proteínas, concentración de sustrato, pH, tiempo y temperatura de incubación.

Los ensayos a diferentes tiempos de incubación (0 - 30 minutos) mostraron que la velocidad permaneció constante por 20 minutos, tanto para la primera como para la segunda etapa de decarboxilación (Figura 14).

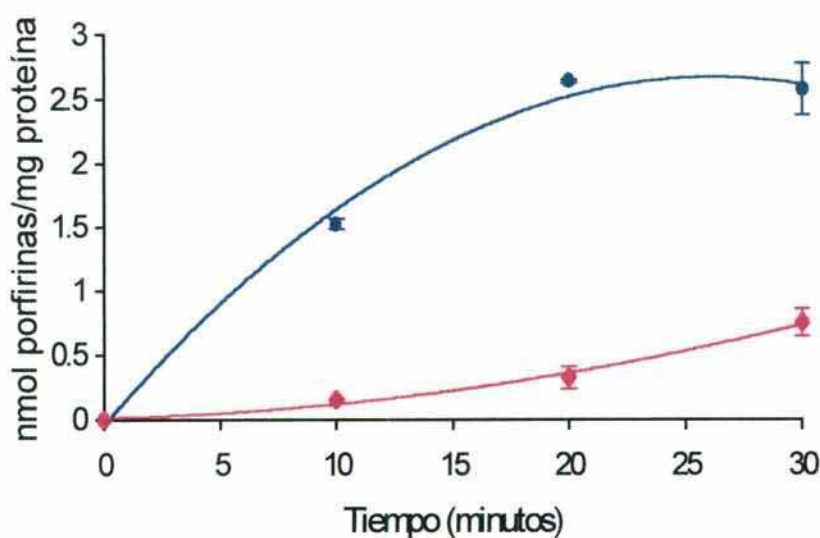


Figura 14. Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad UroD. Los ensayos se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos, usando la fracción 30 – 70 % SSA como fuente enzimática (0,23 mg proteínas/ml) y 5 μ M Urogen III como sustrato. La actividad específica de la primera etapa (—●—) y de la segunda etapa (—♦—) se expresan como la media \pm DS.

Al graficar los porcentajes de los productos formados en función del tiempo de incubación (Figura 15), se pudo comprobar que a los 20 minutos hay un buen porcentaje de transformación del Urogen III en sus productos, lo que le confiere una buena resolución y sensibilidad al método. Los intermediarios de 6 y de 5 COOH, que se detectan desde los 10 minutos de incubación, permanecen constantes hasta los 30 minutos, el heptacarboxiporfirinógeno (7 COOH) aumenta hasta los 20 minutos y luego permanece constante hasta los 30 minutos y el Coprogen III (4 COOH) aumenta a lo largo de todos los tiempos ensayados (Figura 15). A partir de estos datos, se decidió incubar 20 minutos, dado que se obtenía una buena resolución, manteniendo la velocidad inicial.

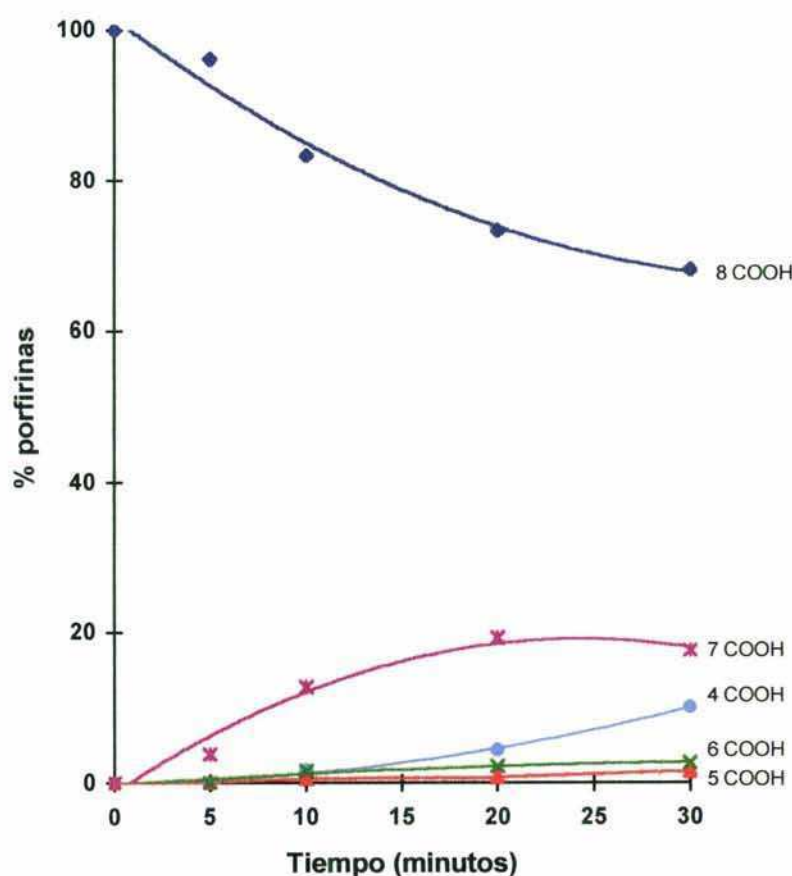


Figura 15. Porcentajes de sustrato remanente (8 COOH), producto final (4 COOH) e intermediarios (7, 6 y 5 COOH) producidos a lo largo de 30 minutos de incubación de la UroD de *Chlorella kessleri* parcialmente purificada (fracción 30 – 70 % SSA) con Urogen III como sustrato. Los ensayos se llevaron a cabo como se describe en la Figura 14.

La curva de actividad vs. sustrato, mostró un incremento de la actividad específica de la primera etapa en función de la concentración de Urogen III incubado, aunque tendía a alcanzar velocidad constante a la mayor concentración ensayada (5 μM) (Figura 16). La actividad específica de la segunda etapa, en cambio, fue constante desde 1,19 μM de sustrato, lo cual podría indicar que una vez que entra el primer sustrato, la segunda etapa queda saturada. Si bien con la mayor concentración ensayada no se alcanzó la velocidad máxima para la primera etapa, se decidió continuar trabajando a una concentración 5 μM de Urogen III en las determinaciones de actividad enzimática, por ser muy cercana a la saturación y conferirle una buena sensibilidad y precisión al ensayo.

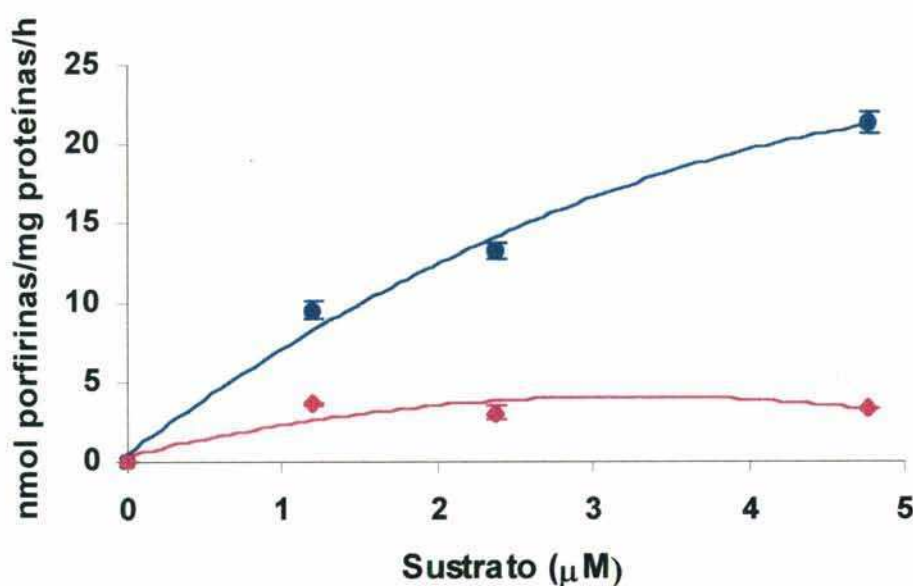


Figura 16. Efecto de la concentración del sustrato sobre la actividad de la UroD de *Chlorella kessleri* parcialmente purificada (fracción 30 – 70 % SSA). Los ensayos se llevaron a cabo como se describe en la Figura 14, usando Urogen III (0 – 5 μM) como sustrato. La actividad específica de la primera etapa (—●—) y de la segunda etapa (—♦—) se expresan como la media \pm DS.

Los estudios de actividad UroD en función de la concentración de proteínas incubadas (Figura 17) mostraron que la actividad aumentó hasta 0,23 mg/ml. A mayores concentraciones de proteínas, la actividad de la primera etapa decreció levemente y la actividad de la segunda etapa permaneció constante durante el resto del rango ensayado. Sobre la base de estos resultados, se decidió continuar trabajando con 0,20 a 0,25 mg proteínas/ml en el medio de incubación.

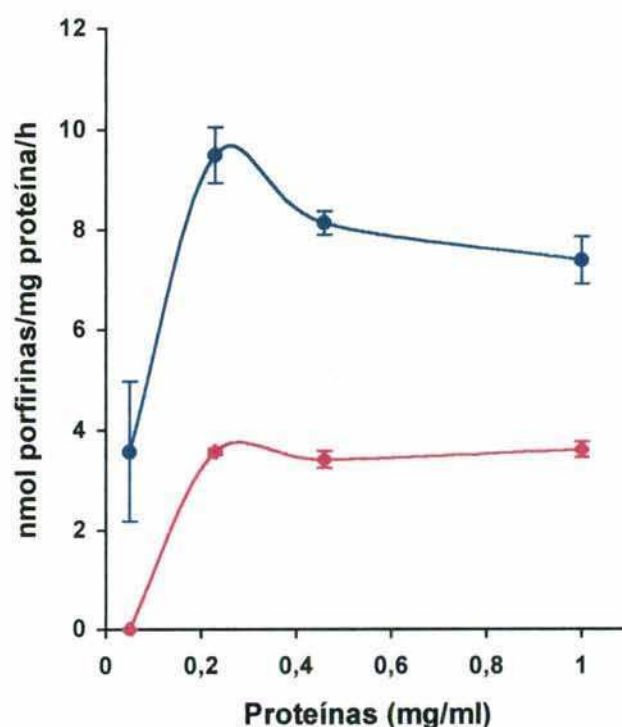


Figura 17. Efecto de la concentración de proteína sobre la actividad de la UroD de *Chlorella kessleri* parcialmente purificada (fracción 30 – 70 % SSA). Los ensayos se llevaron a cabo como se describe en la Figura 14, usando 0,05 – 1 mg proteínas/ml. La actividad específica de la primera etapa (—●—) y de la segunda etapa (—♦—) se expresan como la media \pm DS.

En la Figura 18, se muestra el efecto del pH sobre la actividad enzimática. La actividad de la primera etapa alcanzó un máximo a pH 6,0 - 6,5. La actividad de la segunda etapa mostró muy poca variación con el pH en el rango ensayado. Se continuó trabajando a pH 6,5.

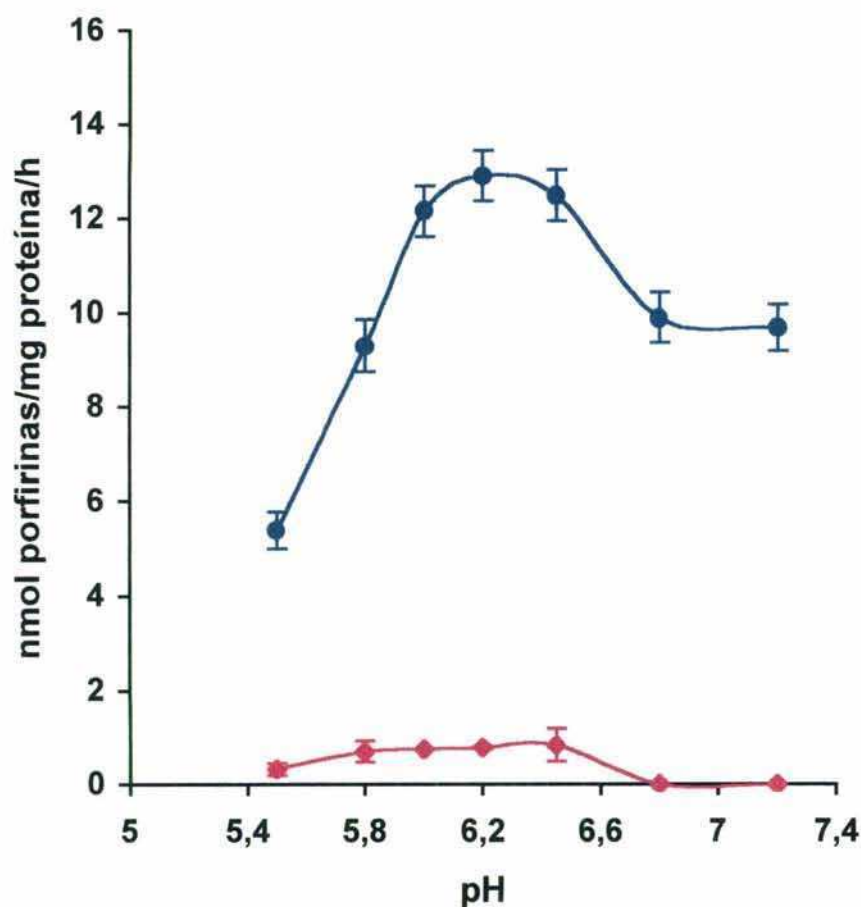


Figura 18. Efecto del pH sobre la actividad de la UroD parcialmente purificada (fracción 30 – 70 % SSA) de *Chlorella kessleri*. Los ensayos se llevaron a cabo como se describe en la Figura 14. La actividad específica de la primera etapa (—●—) y de la segunda etapa (—♦—) se expresan como la media \pm DS.

Los ensayos llevados a cabo a diferentes temperaturas de incubación (0° C - 65° C) mostraron que la actividad aumentó hasta los 45° C y luego sufrió una marcada disminución a temperaturas más altas (Figura 19). Si bien la actividad aumentó hasta los 45° C, se continuó trabajando a 37° C, por ser la temperatura estándar para los ensayos enzimáticos y por presentar mayor actividad que a 25° C (temperatura de crecimiento de los cultivos de *C. kessleri*).

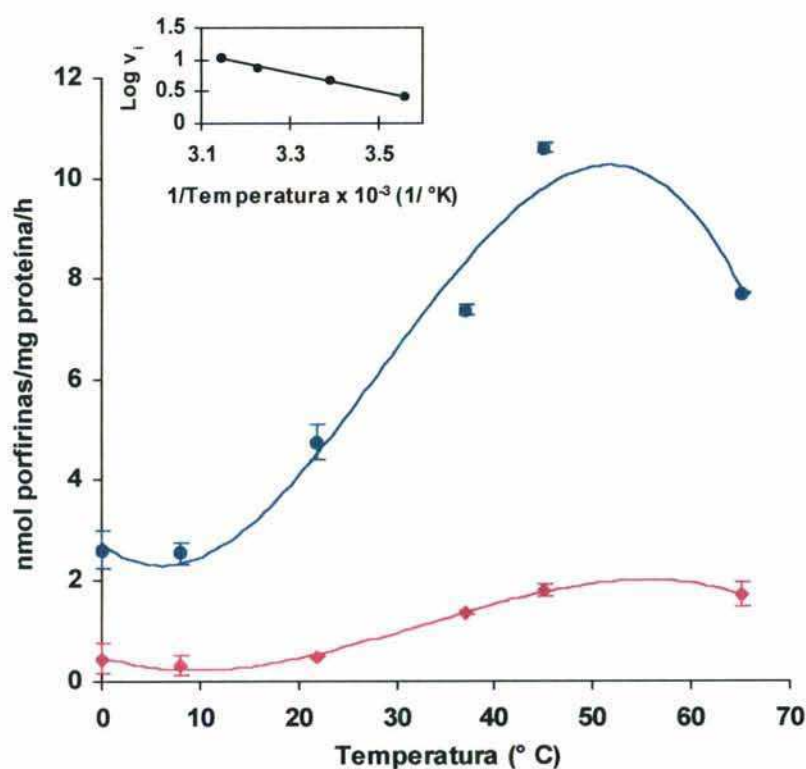


Figura 19. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la UroD parcialmente purificada (fracción 30 – 70 % SSA) de *Chlorella kessleri*. Los ensayos se llevaron a cabo como se describe en la Figura 14. La actividad específica de la primera etapa (—●—) y de la segunda etapa (—♦—) se expresan como la media \pm DS. **Inserto:** Gráfico de Arrhenius de los $\log v_i$ (nmol Urogen III decarboxilado/mg proteínas/h) en función de la inversa de las temperaturas absolutas (° K). La energía de activación de la primera etapa se calculó a partir de la pendiente de la recta obtenida entre 8° y 45° C. En el rango seleccionado, la relación es lineal ($r^2 = 0,9934$) y está descrita por la ecuación $y = -1,4433x + 5,55$.

De los ensayos de estabilidad al almacenamiento, se pudo comprobar que el precipitado 30 - 70 % SSA, guardado a -20°C , mantuvo su actividad por al menos 2 semanas, perdiendo aproximadamente un 50 % a los 2 meses de almacenamiento en esas condiciones (Tabla 3).

Tabla 3. Actividad específica de la UroD parcialmente purificada de *Chlorella kessleri*, en función del tiempo de almacenamiento a -20°C .

Tiempo de almacenamiento (semanas)	Actividad específica (nmol Urogen decarboxilado/mg proteínas/h)	Actividad relativa (%)
0	$13,26 \pm 0,24$	100
2	$13,19 \pm 0,52$	99,5
8	$7,35 \pm 0,11$	55,4

Los ensayos se realizaron como se describe en Materiales y Métodos, utilizando la fracción 30 - 70 % SSA, previamente dializada, como fuente enzimática (0,25 mg proteínas/ml) y $5\text{ }\mu\text{M}$ Urogen III como sustrato.

En resumen, las condiciones de medición de la actividad UroD en *C. kessleri*, para emplear en futuros trabajos, serán: 0,20 - 0,25 mg proteínas/ml, $\sim 5\text{ }\mu\text{M}$ de Urogen III, pH entre 6,0 - 6,5 y 20 minutos de incubación, a 37°C .

II. 3. 3. 6. *Energía de activación*

La energía de activación (E), calculada mediante la ecuación de Arrhenius (Figura 19, inserto), fue 27,6 kJ/mol.

II. 3. 3. 7. *Inmunodetección (Western Blot)*

El ensayo de Western Blot reveló que las muestras algales presentaron inmunorreactividad contra el anticuerpo policlonal anti-UroD de hígado de rata obtenido de conejo (Figura 20), indicando que la UroD de *C. kessleri* comparte algunos determinantes antigénicos con la enzima de hígado de rata. La masa molecular de las bandas inmunorreactivas se estimó mediante el empleo de la curva de calibración correspondiente (Figura 21). El sobrenadante de homogenato exhibió una única banda de alrededor de $116 \pm 7\text{ kDa}$ de masa molecular (Figura 20, banda I). Las muestras de UroD parcialmente purificada (30-70 % SSA y 40-70 % SSA) mostraron la misma banda de $116 \pm 7\text{ kDa}$ y otras dos bandas de $72 \pm 7\text{ kDa}$ y $66 \pm 5\text{ kDa}$, respectivamente (Figura 20, bandas II y III). Además, se observa que, en los precipitados con

sulfato de amonio, cuando aumenta la señal de las bandas II y III, disminuye la señal de la banda I (Figura 20, fracción 40-70 % SSA) y viceversa (Figura 20, fracción 30-70 % SSA). Esto estaría indicando una relación de origen de las bandas II y III con la banda I.

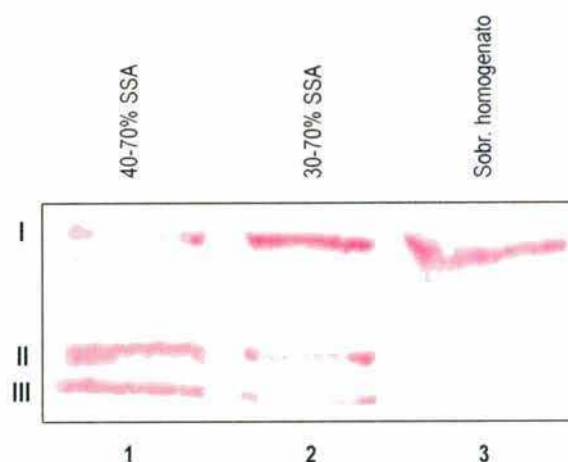


Figura 20. Western Blot del sobrenadante de homogenato y de la UroD parcialmente purificada de *Chlorella kessleri*. Los mismos extractos enzimáticos utilizados para medir la actividad UroD durante el proceso de purificación, fueron sujetos a SDS/PAGE. Las proteínas fueron transferidas electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa y el antígeno específico se detectó incubando la membrana con el anticuerpo anti - UroD de hígado de rata y el complejo ExtrAvidina conjugada a peroxidasa. Calle 1, fracción 40 – 70 % SSA. Calle 2, fracción 3 – 70 % SSA. Calle 3, sobrenadante de homogenato. I, II y III, bandas de ca. 116 ± 7 , 72 ± 7 y 66 ± 5 kDa de masa molecular, respectivamente, según la curva de calibración (Figura 21).

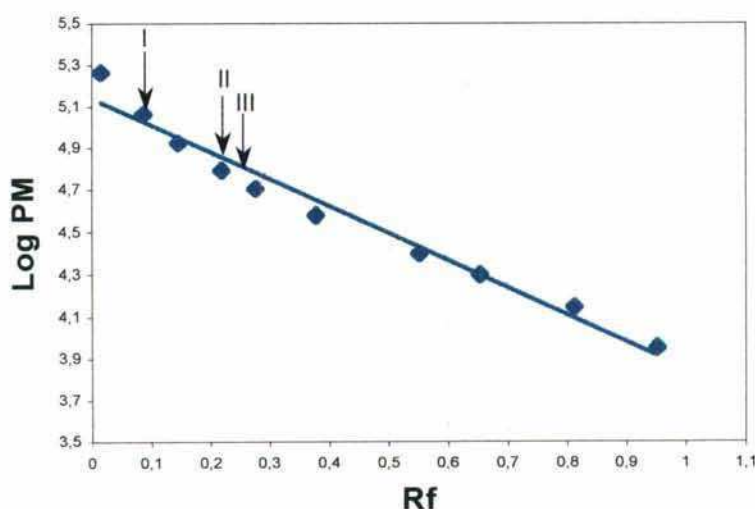


Figura 21. Curva de calibración ($r^2 = 0,972$) del gel de poliacrilamida, obtenida como se detalla en Materiales y Métodos. Las flechas indican las coordenadas correspondientes a las bandas I, II y III detectadas en el Western Blot (Figura 20).

II. 3. 4. Estudios sobre la síntesis de ALA

Para determinar la ruta de síntesis de ALA que opera en *C. kessleri*, se llevaron a cabo ensayos de detección de actividad ALAS en homogenatos celulares crudos y de actividad DOVAT en sobrenadantes de homogenato, obtenidos a partir de ese organismo.

Los valores de la columna izquierda de la Tabla 4 presentan los resultados de los ensayos de actividad ALAS. En tanto que los valores de las dos columnas de la derecha presentan los resultados de las determinaciones de la actividad DOVAT.

Tabla 4. Actividad de síntesis de ALA en *Chlorella kessleri*, detectada en los ensayos de ALAS y DOVAT.

	ALAS	DOVAT	
		Alanina	Ácido Glutámico
ALA sintetizado (μM)	9,67 ± 1,25	49,62 ± 0,84	69,62 ± 1,18
Actividad específica (nmol ALA/mg proteínas/h)	0,60 ± 0,07	2,41 ± 0,04	3,39 ± 0,06
Actividad de síntesis (nmol ALA/10 ⁷ células)	0,098 ± 0,012	0,60 ± 0,1	0,83 ± 0,14

El homogenato celular crudo mostró actividad ALAS, con una actividad específica de 0,60 nmol ALA/mg proteínas/h.

El sobrenadante de homogenato mostró actividad DOVAT y ésta fue un 40 % más alta cuando se utilizó ácido glutámico (3,39 nmol ALA/ mg proteínas/h) que cuando se utilizó alanina como dador de grupos amino (2,41 nmol ALA/mg proteínas/h).

Estos resultados indican que las muestras enzimáticas provenientes de *C. kessleri*, presentan tanto actividad ALAS como actividad DOVAT, siendo los valores de nmol ALA/10⁷ cél. formados por actividad de esta última enzima, aproximadamente un orden de magnitud mayores que los formados por actividad ALAS (Tabla 4).

Para comparar estos resultados con los valores determinados para otras algas, se realizó una búsqueda bibliográfica exhaustiva. En la Tabla 5 aparecen esos valores junto con los obtenidos en el presente trabajo.

Tabla 5. Actividades de las enzimas ALAS y DOVAT de algas, informadas por distintos investigadores.

Enzima	Fuente	Actividad específica (nmol ALA/mg proteínas/h)	Referencia
ALAS	Chlorophyta		
	<i>Chlorella kessleri</i>	0,6	Este trabajo
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	120	Klein <i>et al.</i> 1980
	Euglenophyta		
	<i>Euglena gracilis</i> var. <i>bacillaris</i>	3,8	Beale <i>et al.</i> 1981
	<i>Euglena gracilis</i> cepa Z	9	Beale <i>et al.</i> 1981
	<i>Euglena gracilis</i> cepa Z	0,03	Lombardo <i>et al.</i> 1988
DOVAT	Chlorophyta		
	<i>Chlorella kessleri</i>	3,39 (Glu)*; 2,41 (Ala)*	Este trabajo
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	24 (Glu)*	Klein <i>et al.</i> 1980
	<i>Chlorella vulgaris</i>	23,9 (Glu)*; 20,6 (Ala)*	Gassman <i>et al.</i> 1968
	<i>Chlorella fusca</i> (<i>S. abundans</i>)	17,4 (Glu)*	Meisch <i>et al.</i> 1983
	<i>Chlorella regularis</i>	1,3 (Ala)*	Shioi <i>et al.</i> 1984
	Euglenophyta		
	<i>Euglena gracilis</i>	7,6 (Ala)*	Salvador 1978
	<i>Euglena gracilis</i> cepa Z	0,4 (Glu)*	Lombardo <i>et al.</i> 1988

* Dador de grupos amino incorporado en el sistema de incubación. Glu, ácido glutámico. Ala, alanina.

II. 4. DISCUSIÓN

II. 4. 1. *Caracterización del crecimiento de C. kessleri en cultivo*

El crecimiento de *Chlorella kessleri* en medio BBM glucosa fue mucho mayor que en el medio mineral, y correspondió a la curva de crecimiento típica de cultivos de algas autótrofas (Přibíl y Marvan 1979).

El crecimiento celular, está caracterizado por una curva sigmoidea, en la que se distinguen 3 fases principales: fase lag o de espera, fase de crecimiento exponencial y fase de crecimiento estacionaria. La fase lag es la que sigue a la inoculación y corresponde a un período de adaptación al nuevo ambiente, en el cual el alga debe reorganizar sus componentes micro y macromoleculares (Wang *et al.* 1979). En este caso, no se ha observado fase lag debido, probablemente, a que los inóculos sembrados fueron precultivados en el mismo medio y se encontraban en activo crecimiento.

El aumento de biomasa, medido como absorbancia a 600 nm siguió, en líneas generales, una curva similar a la del número de células, aunque presentó mayores fluctuaciones. Esto puede deberse a problemas de homogeneización y/o turbidez de la alícuota leída, que pueden afectar la lectura espectrofotométrica.

Este estudio, además de permitir caracterizar el crecimiento de *C. kessleri* en cultivo, permitió seleccionar el medio de cultivo y el tiempo de cultivo más adecuados para realizar los estudios de actividad enzimática, como así también para los estudios realizados en el capítulo siguiente.

II. 4. 2. *Estudio sobre las enzimas regulatorias claves de la síntesis de los tetrapirroles en Chlorella kessleri*

En este trabajo se estudió, por primera vez en *Chlorella kessleri*, la actividad de tres enzimas claves en la regulación de la síntesis de los tetrapirroles algales. Se determinó la actividad de dos enzimas relacionadas con la síntesis del primer metabolito del camino (ALA), la ALAS y la DOVAT. El conocimiento de la existencia de estas enzimas en *C. kessleri* permitió dilucidar las vías de síntesis de ALA que operan en este organismo. Por otra parte, se puso a punto la determinación de la actividad de la UroD, enzima ubicada en el punto de

ramificación de la vía, que lleva a la síntesis del hemo y de las clorofilas e involucrada en el control de la distribución de los precursores en el camino de los tetrapirroles celulares. Se establecieron algunas de sus propiedades básicas y se iniciaron estudios de caracterización y de regulación, que constituyen una importante contribución al conocimiento del metabolismo algal.

II. 4. 3. Estudios sobre la UroD

Esta es la primera vez que se realiza un estudio de la actividad UroD en una Chlorophyta y en particular en una cepa del género *Chlorella*. Además, este es el único estudio realizado en algas, luego del que llevaron a cabo Juknat *et al.* (1989) en *Euglena gracilis* (Euglenophyta). En este trabajo de tesis, se aisló y purificó parcialmente la enzima de *C. kessleri*, se determinaron las condiciones óptimas para realizar los ensayos enzimáticos y se hizo una primera caracterización de la misma.

La UroD de *C. kessleri*, enzima clave del camino biosintético de la clorofila, presentó la mayor actividad específica en los extractos enzimáticos obtenidos de células que se encontraban en la fase exponencial de crecimiento. En esta fase, también fue máximo el contenido de clorofila *a* por célula. Estos resultados concuerdan con la importancia clave de la UroD en el control de la síntesis de la clorofila (Grimm 1998; Martins *et al.* 2001), tomando en cuenta que las células algales presentan la mayor actividad de síntesis de este compuesto durante su fase de activo crecimiento, la cual decrece gradualmente a medida que las células envejecen (Stewart 1974).

El perfil cromatográfico de los productos de reacción formados durante la incubación de la UroD de *C. kessleri* fue similar a los perfiles informados para la UroD de diferentes fuentes, tales como hígado de rata (Ríos de Molina *et al.* 1987), bacterias (Koopmann *et al.* 1986) y *Euglena gracilis* (Juknat *et al.* 1989). Además, este perfil mostró la prevalencia de la porfirina de 7 carboxilos sobre las de 6 y 5 carboxilos. Esto sugiere que la decarboxilación del 7 COOH porfirinógeno es el paso velocidad limitante en la reacción catalizada por la UroD de *C. kessleri*, como se ha reportado para hígado bovino (Straka y Kushner 1983), hígado de rata (Ríos de Molina *et al.* 1987), eritrocitos de pollo (García *et al.* 1973) y UroD bacteriana (Koopmann *et al.* 1986): $v_1 \gg v_2$, siendo v_1 la velocidad de la primera etapa de decarboxilación del Urogen y v_2 la velocidad de la segunda etapa (formación del Coprogen).

Estos resultados también están de acuerdo con la evolución del porcentaje de las distintas porfirinas formadas a lo largo del tiempo de incubación, ya que el análisis de los mismos indicó que la 7 COOH porfirina es el único intermediario que se acumula durante los distintos tiempos ensayados. Esto sugiere, nuevamente, que la decarboxilación del 7 COOH porfirinógeno es el paso velocidad limitante de la decarboxilación del Urogen III.

Como un primer paso de purificación enzimática, se ensayó el fraccionamiento salino, ya que independientemente de lograr o no un alto grado de purificación, permitía concentrar la muestra y almacenarla por períodos prolongados con baja pérdida de actividad (Koopmann *et al.* 1986). En el caso de *C. kessleri*, las muestras mantuvieron el 100 % de actividad por 2 semanas, lo que permitió realizar distintos ensayos a partir de un mismo cultivo. Por otra parte, se decidió no utilizar preparaciones enzimáticas con mayor tiempo de almacenamiento, debido a que el ensayo de 2 meses presentó un 50 % de pérdida de actividad. Como se especificó en Resultados (ítem II. 3. 3. 4.), el rango 20-70 % SSA se descartó de entrada, dado su bajo grado de purificación y su alta contaminación con clorofila, la que podía interferir con la determinación de la actividad. Por otra parte, se decidió continuar trabajando con la fracción 30-70 % SSA para los estudios de caracterización, dado que la UroD se purificaba aproximadamente 2 veces en comparación con el sobrenadante de homogenato inicial y con un rendimiento mayor que la fracción 40-70 % SSA. Tanto en el rango 30-70 % SSA como en el rango 40-70 % SSA, el grado de purificación y el rendimiento de la primera etapa fueron similares al de la segunda etapa. Estos resultados sugerirían que, al igual que lo informado para otros organismos, ambas etapas de la decarboxilación del Urogen III estarían catalizadas por una única enzima (Kawanishi *et al.* 1983; Koopmann *et al.* 1986; Martins *et al.* 2001). Mediante el procedimiento de purificación parcial empleado en este trabajo, se obtuvo una recuperación semejante a la obtenida por Juknat *et al.* (1989) trabajando con extractos de *Euglena gracilis* (aproximadamente 50 %). Pero al comparar las actividades específicas de ambas preparaciones parcialmente purificadas, se comprueba que la UroD de *C. kessleri* purificada aproximadamente 2 veces, tiene una actividad (3,52 nmol Copro III/mg proteínas/h) 5 veces mayor que la UroD de *Euglena gracilis* purificada aproximadamente 200 veces (0,77 nmol Copro III/mg proteínas/h). Esto podría deberse a una diferente afinidad por el sustrato de la UroD de distintas especies algales. Aunque no puede descartarse que, en *C. kessleri*, la UroD esté en una mayor proporción respecto de las proteínas totales. Otra

posibilidad es que la mayor relación sustrato/proteína aquí ensayada (20 nmoles Urogen/mg de proteína contra la relación 0,2 nmoles Urogen/mg de proteína, empleada con *Euglena gracilis*) haya favorecido la obtención de una mayor actividad específica.

El análisis del efecto de las condiciones de ensayo sobre la actividad UroD de *C. kessleri*, permitió establecer las condiciones más adecuadas para la determinación de su actividad. Analizando el efecto de la concentración de proteínas incubada, puede observarse que en las concentraciones más altas (más de 0,23 mg proteínas/ml) disminuye la velocidad. La caída de actividad UroD a altas concentraciones de proteínas ha sido reportada por Chaufan *et al.* (2001) trabajando con hígado de rata, quienes propusieron que podría deberse a una disminución en la relación sustrato/proteína, lo cual afectaría la actividad enzimática. Otra posible causa, puede ser la formación de especies multiméricas (Kawanishi *et al.* 1983; Ríos de Molina *et al.* 1996), que producirían un impedimento estérico, evitando o dificultando la entrada del sustrato al sitio activo y reduciendo así la actividad enzimática.

Los estudios de actividad específica en función de la concentración de sustrato, indicaron que en el caso de la UroD de *C. kessleri*, una concentración 5 μ M de Urogen III estaría cercana a la zona de saturación. Los datos existentes en la literatura son: 12 μ M para *Rhodobacter sphaeroides* (Jones y Jordan 1993), 20 μ M para *Rhodopseudomonas palustris* (Koopmann *et al.* 1986), 0,5 μ M para *Euglena gracilis* (Juknat *et al.* 1989), 6-14 μ M para hígado de rata (Ríos de Molina *et al.* 1987; Chaufan *et al.* 2001), 5 y 25 μ M para hígado bovino (Straka y Kushner 1983). Estos últimos autores informan la existencia de 2 mesetas en las curvas de actividad vs. concentración de sustrato, razón por la cual calculan incluso dos K_m , indicando que la enzima presentaría distinta afinidad por su sustrato a bajas y a altas concentraciones del mismo. Los resultados expuestos aquí, para *C. kessleri*, están dentro de los valores informados por esos autores para la primera meseta, pero no puede asegurarse que esa sea la mínima concentración de saturación ni si existe o no una segunda meseta en *C. kessleri*. En ensayos realizados a mayores concentraciones (hasta 20 μ M de Urogen III) los resultados no fueron reproducibles, debido a la baja sensibilidad del método al quedar una alta concentración de sustrato remanente, y a la inhibición por sustrato que se presenta (Juknat *et al.* 1989). Comparando los resultados obtenidos en el único trabajo realizado con la UroD proveniente de una fuente algal, se comprobó que la UroD de *C. kessleri* tiene menor afinidad por el Urogen III que la enzima proveniente de *E. gracilis*, dado que satura a una concentración 10

veces mayor ($5 \mu\text{M}$ vs $0,5 \mu\text{M}$). Sin embargo, la $V_{\text{máx.}}$ obtenida con el sobrenadante de homogenato es 16 veces mayor ($1,75 \text{ nmol Copro III/mg proteínas/h}$ vs $0,11 \text{ nmol Copro III/mg proteínas/h}$), lo que estaría indicando una mayor eficiencia.

El efecto del pH sobre la actividad UroD, mostró un pH óptimo en el rango 6 - 6,5. Este valor es mucho menor que el único reportado para algas (7,2 en *Euglena gracilis*; Juknat *et al.* 1989) y levemente más bajo que el rango óptimo de 6,7 - 6,9 reportado para *Rhodobacter sphaeroides* (Jones y Jordan 1993), donde también se observó una actividad más o menos constante en un rango de 0,5 unidades de pH. Además, el pH óptimo obtenido para *C. kessleri*, también es levemente más bajo que el valor de 6,9 informado para *Rhodopseudomonas palustris* (Koopmann *et al.* 1986) y que el valor de 6,8 informado para la UroD humana (de Verneuil *et al.* 1983b), de pollo (Kawanishi *et al.* 1983), de levaduras (Felix y Brouillet 1990) y de hígado de rata (Chaufan *et al.* 2001). Aunque estos últimos autores informaron un pH óptimo cercano al de *C. kessleri* para la UroD de ratas porfíricas (6,4). De todas maneras, al analizar todos estos datos en conjunto, se observa un estrecho rango de pH ($6,6 \pm 0,5$) en el que se mueven los pH óptimos de sistemas muy diversos, lo que podría indicar la existencia de un mecanismo de decarboxilación análogo en todos ellos. Por otra parte, la actividad de la segunda etapa mostró muy poca variación con el pH del medio de incubación. Esto estaría de acuerdo con el mecanismo de acción de la UroD propuesto por Whitby *et al.* (1998), quienes establecen que la UroD es un homodímero y el Urogen III entraría al sitio activo de uno de los monómeros, sufriría su primera decarboxilación y luego se desplazaría, dentro del dímero, hasta alcanzar un sitio en el otro monómero, para continuar decarboxilándose. Por lo tanto, el hecho de que el sustrato no saldría del complejo proteico hasta llegar al producto final, justificaría que el pH del medio influya poco en la velocidad de las decarboxilaciones intermedias.

El valor de la energía de activación calculado ($E = 27,6 \text{ kJ/mol}$) corresponde al primer paso de decarboxilación (8 COOH a 7 COOH). Si bien existen pocos datos en la literatura acerca de este parámetro, los valores reportados son del mismo orden de magnitud que el calculado aquí para *C. kessleri*: $40,0 \text{ kJ/mol}$ para eritrocitos de pollo (Garcia *et al.* 1973); $8,3 \text{ kJ/mol}$ y $10,8 \text{ kJ/mol}$ para hígado de ratas normales y porfíricas (Chaufan *et al.* 2001); $52,7 \text{ kJ/mol}$ para el cangrejo *Chasmagnathus granulatus* (Corvi *et al.* 1999). Esta similitud entre los valores de energía de activación, también estaría de acuerdo con la existencia de un mecanismo análogo.

Para la segunda etapa de decarboxilación (7 COOH a 4 COOH), no se determinó el valor de la energía de activación, ya que no puede calcularse de esta manera, debido a que en ella están involucradas más de una reacción elemental (García *et al.* 1973).

El hecho de que los aminoácidos de la UroD están altamente conservados en todos los organismos estudiados (Mock *et al.* 1995; Whitby *et al.* 1998; Martins *et al.* 2001), justificaría la inmunorreactividad cruzada de la UroD de *C. kessleri* con el anticuerpo de un organismo tan diferente como la rata, aquí demostrada. Dado que los resultados del Western blot mostraron que existían tres especies inmunorreactivas y que en aquellas fracciones en las que la banda de mayor peso molecular aumentaba, disminuían las dos bandas de menor peso molecular y viceversa, es posible que la UroD de *C. kessleri* corresponda a un heterodímero. La masa molecular sería ca. 116 ± 7 kDa para el dímero y ca. 66 ± 5 kDa y 72 ± 7 kDa para cada uno de sus monómeros. Como detallamos en la introducción, varios grupos de investigación han propuesto que la formación de un dímero sería una propiedad de esta enzima (Phillips *et al.* 1997; Whitby *et al.* 1998; Martins *et al.* 2001). El Western blot del sobrenadante de homogenato reveló únicamente la banda de mayor peso molecular. Esto podría estar mostrando que la conformación de la UroD de *C. kessleri* en su estado fisiológico, sería dimerica. Sin embargo, si la unidad activa *in vivo* en *C. kessleri* y en otros organismos realmente es el dímero, todavía necesita verificarse por análisis bioquímicos y estructurales de complejos proteína-proteína y proteína-ligando (Martins *et al.* 2001).

La inmunorreactividad cruzada de la UroD de *C. kessleri*, el valor de energía de activación y el estrecho rango de pH óptimos informados y discutidos aquí, junto con la alta homología entre la UroD de diversas fuentes informada por otros investigadores (Mock *et al.* 1995; Whitby *et al.* 1998; Martins *et al.* 2001), hace pensar que el mecanismo de decarboxilación del Urogen III sería un proceso altamente conservado.

II. 4. 4. Estudios sobre la síntesis de ALA

Los ensayos llevados a cabo para determinar la actividad de la/s enzima/s involucrada/s en el primer paso regulatorio del camino biosintético del hemo y de las clorofilas (síntesis de ALA) en *Chlorella kessleri*, permitieron detectar tanto actividad ALAS como actividad DOVAT. La actividad de esta última enzima, pudo comprobarse en presencia de dos aminoácidos distintos

actuando como dadores de grupos amino, el ácido glutámico y la alanina. Al igual que lo informado por Lombardo *et al.* (1988) para *Euglena gracilis*, la actividad DOVAT determinada en este trabajo para *C. kessleri*, fue un orden de magnitud mayor que la actividad ALAS.

En otros sistemas, tales como *Scenedesmus obliquus* y *Euglena gracilis* (Weinstein y Beale 1983), se ha planteado que existirían las dos rutas de síntesis de ALA, es decir el “camino de Shemin o de 4 carbonos” y el “camino de 5 carbonos”, siendo este último su principal vía de síntesis. Si bien existen controversias sobre el rol del DOVA en el “camino de 5 carbonos”, sugiriéndose tanto que éste sería un intermediario de la síntesis de ALA como que podría ser un producto de la desaminación de este último (Foley y Beale 1982; Leeper 1985), Klein *et al.* (1980) y Dörnemann *et al.* (1990), afirman que el DOVA efectivamente sería un intermediario de la síntesis de ALA por la “ruta de 5 carbonos” en *Scenedesmus obliquus*, al igual que lo informado por Salvador (1978) y Lombardo *et al.* (1988) para *Euglena gracilis*. La actividad DOVAT aquí determinada, también indicaría que en *C. kessleri* el DOVA sería un intermediario en la ruta de 5 carbonos.

La detección de actividad de la enzima ALAS en *C. kessleri* está de acuerdo con los resultados obtenidos por otros autores trabajando con extractos provenientes de otras algas (Tabla 5). Si bien, la existencia de esta enzima ha sido previamente informada en una especie de Chlorophyta y en algunas cepas de Euglenophyta (Klein *et al.* 1980; Beale *et al.* 1981; Lombardo *et al.* 1988; Mayer y Beale 1992), algunos autores no pudieron detectar su actividad en otras especies de Chlorophyta (*C. vulgaris* y *C. fusca* = *S. abundans*) y en una cepa de Euglenophyta (*E. gracilis* var. *bacillaris*) (Beale 1971; Porra y Grimme 1974; Gómez-Silva *et al.* 1985). Por lo tanto, esta es la primera vez que se detecta (aunque con valores bajos) la existencia de esta actividad en *C. kessleri*, una especie que es filogenéticamente muy cercana a *C. vulgaris* y que pertenece, junto con ella, al género *Chlorella sensu stricto* (Capítulo I). Las dificultades encontradas por algunos autores en las determinaciones de la actividad de esta enzima, podrían deberse a la vida media muy corta que la caracteriza (entre 30 minutos y 1 hora) (Granick y Beale 1978; Dailey 1997), a la posible existencia de inhibidores, informada en extractos algales y en extractos de plantas superiores (Beale 1978) o a una baja proporción de esta proteína enzimática, respecto de las proteínas totales.

El valor de actividad específica de ALAS obtenido en *C. kessleri* es un orden de magnitud mayor que el obtenido por Lombardo *et al.* (1988) para *Euglena gracilis* cepa Z, pero es mucho más bajo que los reportados por Klein *et al.* (1980) para *Scenedesmus obliquus* y Beale *et al.* (1981) para dos cepas de *Euglena gracilis*. Debe tenerse en cuenta que estos últimos autores realizaron los ensayos suplementando los incubados con Succinil-CoA o con un sistema generador de Succinil-CoA, mientras que en este trabajo se asumió que el homogenato celular crudo de *C. kessleri*, utilizado como fuente enzimática, aportaba todos los precursores necesarios para la síntesis de ALA. Esta diferencia metodológica podría explicar los menores niveles de actividad detectados en los ensayos realizados en el presente trabajo. Por otro lado, tampoco puede descartarse la diferencia de comportamiento inherente a la cepa y/o especie algal, ya que al comparar las actividades informadas para *Euglena gracilis*, puede observarse que dos cepas de una misma especie presentan valores de actividad ALAS muy diferentes.

Como se observa en la Tabla 5, la existencia de actividad DOVAT fue confirmada en seis especies algales. Los valores de actividad de esta enzima, obtenidos para *C. kessleri*, son muy semejantes a los detectados en *C. regularis*. Sin embargo difieren en alrededor de un orden de magnitud con los detectados en las otras algas estudiadas (Tabla 5). En este caso, al igual que en el de ALAS, la diferencia en los valores de actividad específica de la DOVAT se pueden deber a diferencias metabólicas de las especies algales empleadas.

En *C. kessleri*, la mayor actividad DOVAT se detectó en presencia de ácido glutámico como dador de grupos amino, lo cual concuerda con lo informado por Gassman *et al.* (1968), Meisch *et al.* (1983) y Lombardo *et al.* (1989) para otras algas. Esto puede deberse a que la alanina sólo puede entrar en la síntesis de ALA como dador de grupos amino a nivel de DOVAT, mientras que el ácido glutámico, además de actuar en este punto, puede contribuir a la síntesis de ALA por su participación en las vías a y b (Figura 3).

Los resultados aquí presentados sobre las actividades ALAS y DOVAT, podrían indicar que, como en el caso de *Scenedesmus obliquus* y *Euglena gracilis*, en *Chlorella kessleri* operarían las dos rutas de síntesis de ALA. Dado que el valor de la actividad DOVAT (0,83 nmol ALA/10⁷ cél./h), cuando se compara en relación con la biomasa celular, es un orden de

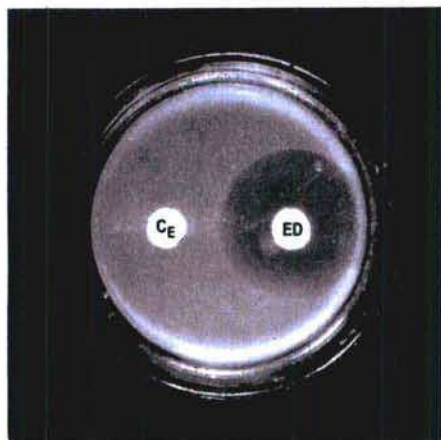
magnitud mayor que el valor de actividad ALAS ($0,098 \text{ nmol ALA}/10^7 \text{ cél./h}$), puede suponerse que la ruta de 5 carbonos también operaría como vía principal de síntesis de ALA en este organismo.

II. 5. CONCLUSIONES

En este capítulo se presentaron los resultados obtenidos al estudiar las actividades de tres enzimas involucradas en dos pasos regulatorios claves del camino de síntesis de los tetrapirroles algales. Sobre la base de esos resultados puede concluirse que:

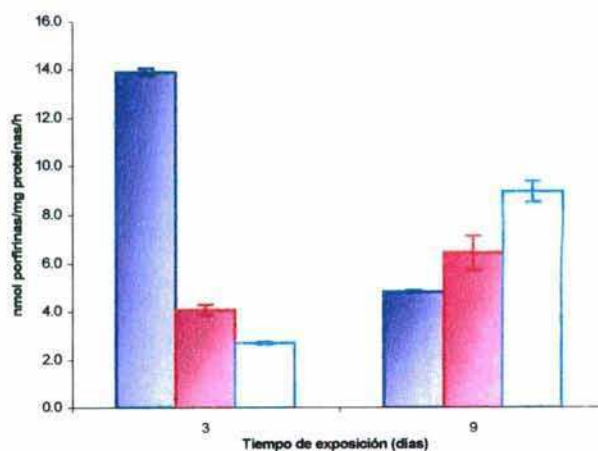
- ❖ En *Chlorella kessleri* operarían las dos rutas de síntesis del primer precursor de los tetrapirroles celulares (ALA): el Camino de Shemin o de 4 carbonos y el Camino de 5 carbonos.
- ❖ En *Chlorella kessleri*, la ruta de 5 carbonos operaría como vía principal de síntesis de ALA y el DOVA sería uno de sus intermediarios.
- ❖ En la vía alternativa a través de DOVA, durante la transaminación por DOVAT, el ácido glutámico actúa como un dador de grupos amino más efectivo que la alanina.
- ❖ En *Chlorella kessleri*, la decarboxilación del Urogen III está catalizada por la enzima UroD. Esta es la primera vez que se realiza un estudio de la actividad UroD en una Chlorophyta, y la primera vez que se aísla y purifica parcialmente la UroD de *Chlorella kessleri*. Además, este es el único estudio realizado en algas, luego del que se llevara a cabo en *Euglena gracilis*.
- ❖ La actividad de la UroD de *Chlorella kessleri* en distintas etapas de desarrollo fue máxima en la fase exponencial de crecimiento, coincidente con el máximo contenido celular de clorofila, confirmando el rol clave de esta enzima en la regulación de la síntesis de los tetrapirroles.
- ❖ La medición de actividad UroD, puede utilizarse como un biomarcador de contaminación, ensayándola bajo las condiciones aquí propuestas. Bajo estas condiciones el porcentaje de transformación del Urogen III es alto, por lo que en caso de haber inhibición, el método continúa siendo lo suficientemente sensible como para detectarla. Precipitando las muestras con sulfato de amonio en el rango 30-70 % de saturación, mejora la sensibilidad del método y además permite almacenar las muestras, al menos por 15 días, sin pérdida de actividad (capítulo III).

- ❖ En *Chlorella kessleri*, la decarboxilación del Urogen III, por acción de la UroD, ocurre en dos etapas, vía la formación de hepta, hexa y penta carboxiporfirinógenos, siendo la decarboxilación del heptagen el paso velocidad limitante.
- ❖ En *Chlorella kessleri*, ambas etapas de decarboxilación del Urogen III están catalizadas por una única enzima.
- ❖ La UroD de *Chlorella kessleri* muestra inmunorreactividad cruzada con la UroD de hígado de rata, indicando que comparte algunos determinantes antigénicos con la UroD de ese organismo.
- ❖ La UroD de *Chlorella kessleri* probablemente es un heterodímero de ca. 116 ± 7 kDa de masa molecular, formado por dos monómeros de ca. 66 ± 5 kDa y ca. 72 ± 7 kDa que copurifican en el protocolo de purificación aquí aplicado. Posiblemente, el dímero actúe a través de un mecanismo de canal, formado por los centros activos de sendos monómeros.



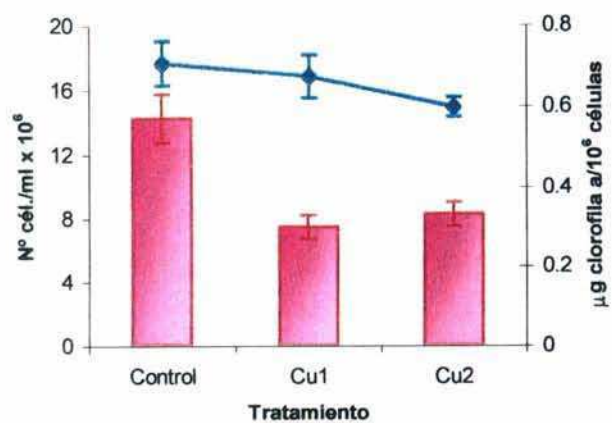
CAPÍTULO III

POTENCIALES APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS Y ECOTOXICOLÓGICAS DE CULTIVOS DE *CHLORELLA KESSLERI* (TREBOUXIOPHYCEAE, CHLOROPHYTA)



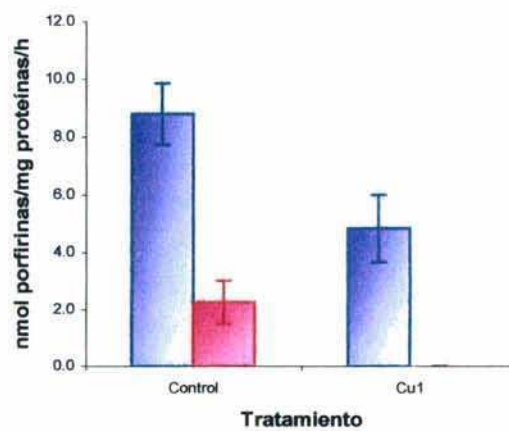
En las últimas décadas han recobrado impulso en el mundo las investigaciones relacionadas con el cultivo de microalgas. Los principales esfuerzos se han dirigido a la utilización de microalgas como alimento, biofertilizantes, biomarcadores de contaminación de aguas, tratamiento de efluentes cloacales y residuos industriales y para la obtención de nuevos fármacos como vitaminas, pigmentos, antibióticos, etc. (Borowitzka 1995; Apt y Behrens 1999; Lam *et al.* 1999).

Los estudios realizados en los capítulos anteriores, permitieron tener un panorama claro de la identidad, biología, crecimiento y pasos enzimáticos claves de la biosíntesis de clorofila en la cepa BAFC CA 10 de *Chlorella kessleri*. En este capítulo, a lo largo de tres secciones, se abordarán dos aspectos importantes de la biología aplicada de las microalgas: la potencial aplicación de esta especie y alguna de sus propiedades como índice de contaminación ambiental con metales (Sección A) y xenobióticos (Sección B) y su potencial aplicación como fuente de compuestos biológicamente activos (Sección C).



III. SECCIÓN A

BIOENSAYOS DE TOXICIDAD DE METALES



III. A. 1. INTRODUCCIÓN

Las algas son comúnmente utilizadas como biomarcadores en las normas de verificación de la calidad de los cuerpos de agua, incluyendo efluentes cloacales e industriales (Lam *et al.* 1999).

El fitoplancton forma el grupo más importante de productores primarios en la cadena trófica acuática y el estrés por tóxicos puede alterar su composición y abundancia, dependiendo del estado fisiológico de las poblaciones en el momento del agregado del tóxico. Las algas verdes (Chlorophyta) son uno de los principales componentes del fitoplancton. A su vez, el género *Chlorella* (Chlorophyta) es muy común en todos los cuerpos de agua dulce y conjuntamente con otras algas unicelulares juega un rol relevante en la producción primaria y reciclado de nutrientes, constituyendo la base del flujo de energía en las cadenas tróficas de los ecosistemas acuáticos. Por lo tanto, cualquier impacto adverso de los contaminantes sobre ellas, puede afectar a los organismos de los niveles tróficos más altos y tener importantes consecuencias sobre la integridad del ecosistema acuático completo. Es por ello que las microalgas fitoplanctónicas son usadas para medir los efectos tóxicos de distintos contaminantes como metales pesados, pesticidas, hidrocarburos y efluentes industriales. Además de la relativa facilidad de realización y repetición de los resultados de los ensayos de toxicidad algal (Stauber 1995), el uso de microalgas presenta varias ventajas: 1) son organismos sensibles a los tóxicos, mostrando incluso una mayor sensibilidad que las especies animales hacia distintos contaminantes (metales pesados, detergentes surfactantes, acridinas, colorantes, combustibles sintéticos, herbicidas, hidrocarburos aromáticos polihalogenados, etc.); 2) son fácilmente manejables en cultivos de laboratorio, formando suspensiones homogéneas en los medios de cultivo y creciendo bien bajo condiciones definidas; 3) tienen un tiempo generacional corto, con curvas de crecimiento exponencial; 4) muestran una rápida respuesta fisiológica. Por lo tanto, los efectos nocivos de los tóxicos pueden detectarse en un período de tiempo corto.

En los últimos años, los investigadores se han interesado ampliamente en el estudio del efecto de diversos contaminantes sobre los organismos vivos, motivados por el alarmante incremento de la contaminación ambiental en todos los niveles y, específicamente, en el ambiente acuático. Las actividades humanas domiciliarias e industriales son procesos que alteran la biósfera e impactan directamente sobre la biodiversidad (Woodruff 2001; Baos *et al.*

2002). Numerosos estudios de laboratorio y de poblaciones naturales han demostrado que los metales pesados son extremadamente tóxicos para las microalgas (Baos *et al.* 2002).

La contaminación de los ambientes acuáticos por metales, como el cobre, ocurre como resultado de diversas actividades humanas, tales como explotación minera, procesamiento de metales, industrias químicas, plantas de energía térmica, quema de combustibles fósiles, actividades agrícolas intensivas, descarga y desagüe de aguas residuales urbanas y de plantas de tratamiento municipal e industrial (Jeong *et al.* 1999; Franklin *et al.* 2000; Davis *et al.* 2001; Gove *et al.* 2001; Xue *et al.* 2002; Khangarot y Rathore 2003; Ma *et al.* 2003). Estas actividades intensivas han llevado a un ingreso considerable de cobre en las aguas superficiales receptoras, llegando en algunos casos a concentraciones que exceden los valores permitidos en los Criterios de Calidad de Agua (Xue *et al.* 2002). Así, los iones cobre finalmente llegan al ecosistema acuático y crean problemas de contaminación, tendiendo a acumularse en los organismos de agua dulce (Khangarot y Rathore 2003) y afectándolos a nivel bioquímico, celular, poblacional y de comunidades (Franklin *et al.* 2000).

Aunque el cobre es un elemento esencial, que se requiere en cantidad de trazas para la sustentación de todos los organismos terrestres y acuáticos (Lee y Allen 1998; Landner y Lindestrom 1999; Sigg *et al.* 1999), la exposición a altos niveles del mismo, tiene efectos dramáticos sobre las comunidades algales (Baos *et al.* 2002), por lo que la regulación de su descarga es de vital importancia. Como micronutriente, el cobre es esencial para los procesos metabólicos de las algas, principalmente porque interviene en la composición de diferentes enzimas (Marschner 1993). El cobre es uno de los metales más tóxicos para las microalgas (Franklin *et al.* 2000). Su toxicidad se debe principalmente al ion divalente libre (Cu^{2+}) y en concentraciones por encima de las requeridas para el crecimiento óptimo, interfiere con numerosos procesos de vital importancia, habiéndose informado que: 1) inhibe el crecimiento y provoca una disminución de clorofila o clorosis (Prasad *et al.* 1998; Rama Devi y Prasad 1998; Gonzales *et al.* 1998); 2) inhibe la división celular (Ahmed y Abdel-Basset 1992; Guanzon *et al.* 1994) impidiendo que se complete la citocinesis y llevando a la producción de células anormalmente grandes o deformadas; 3) inhibe la fotosíntesis a través de la interrupción del transporte de electrones del fotosistema II (Vavilin *et al.* 1995; Küpper *et al.* 2002); 4) disminuye el contenido de pigmentos y en particular de clorofila, debido a una inhibición de su

síntesis (Lam *et al.* 1999), a una degradación de los mismos, y a una pérdida de la integridad morfológica del cloroplasto por provocar una desintegración de las membranas tilacoidales; 5) afecta la permeabilidad celular o la unión de metales esenciales (Stauber y Florence 1987) induciendo la pérdida de cationes y afectando la captación de micronutrientes esenciales (Sunda y Huntsman 1998a; Küpper *et al.* 2002); 6) afecta la motilidad celular (Lage *et al.* 1994b); 7) provoca la oxidación de compuestos tales como proteínas, lípidos, esteroides y ácidos grasos libres (Lage *et al.* 1994a y b; Vavilin *et al.* 1998). Para que el Cu^{2+} ejerza su efecto adverso sobre las células, primero debe unirse a receptores sobre la superficie celular (grupos COOH^- , SH^- , fosfátidos), seguido por transporte activo a través de la membrana (Knauer *et al.* 1997; Fox y Gueriot 1998) y liberación en el interior del citoplasma (Sunda y Huntsman 1998b). Allí, se une a ligandos específicos (Gledhill *et al.* 1997) y reacciona con grupos SH^- enzimáticos y con grupos tioles libres (por ej. de glutatión), pudiendo bloquear sitios activos e inhibir la actividad de diferentes enzimas, incluyendo enzimas de la biosíntesis de clorofila como la UroD (Jones y Jordan 1993; Lam *et al.* 1999; Chaufan *et al.* 2001; Küpper *et al.* 2002). Además, la intoxicación con metales pesados involucra diferentes mecanismos generadores de especies reactivas de oxígeno como radicales hidroxilo, anión superóxido y oxígeno singlete, disparando un daño oxidativo en proteínas, ácidos nucleicos y lípidos (Nagalakshmi y Prasad 1998; Babu *et al.* 2002; Rijstenbil y Gerringa 2002). Este estrés oxidativo desencadena diferentes respuestas antioxidantes, tales como incremento de la actividad de enzimas antioxidantes (catalasa, superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa y glutatión-S-transferasa) y producción de compuestos antioxidantes de bajo peso molecular como glutatión, ascorbato, α -tocoferol, carotenoides y fenoles (Nagalakshmi y Prasad 1998; Okamoto *et al.* 2001; Lei *et al.* 2003).

La tasa de incorporación del metal a la célula y la toxicidad del mismo no dependen de la concentración total del metal en el ambiente, sino de su especiación y de la concentración del catión divalente libre (Cu^{2+}). La toxicidad del cobre hacia la biota de agua dulce es afectada por variables como pH, temperatura, concentración de oxígeno disuelto, dureza del agua, concentración de ligandos inorgánicos y orgánicos (incluyendo los producidos biológicamente), etc., que afectan la especiación y solubilidad del metal en fase acuosa (Xue *et al.* 1996; Franklin *et al.* 2000). Todos esos factores modifican la toxicidad, por aumentar o disminuir la concentración biodisponible requerida para producir una respuesta biológica

particular (Chapman 1995). Las algas, además, pueden responder al aumento de *metales traza* (micronutrientes requeridos en muy baja concentración) en el ambiente, produciendo ligandos orgánicos fuertes (Pistocchi *et al.* 2000; Lombardi y Vieira 2000; Rijstenbil y Gerringa 2002) que, si son liberados en cantidades suficientes, reducen la biodisponibilidad del cobre en fase acuosa (Gledhill *et al.* 1999; Rijstenbil y Gerringa 2002). Además, las células algales presentan otros mecanismos de exclusión del metal (o prevención de la acumulación del ion libre dentro de la célula): captación selectiva, disminución de la permeabilidad de la membrana (Yan y Pan 2002) e inmovilización del metal en la pared celular (Kiefer *et al.* 1997; Gledhill *et al.* 1999; Macfie y Welbourn 2000); y mecanismos de detoxificación intracelular: bioacumulación por producción de compuestos que se unen al metal, como las proteínas metalotioneínas y/o los polímeros polifosfatos (Wu *et al.* 1998; Gledhill *et al.* 1999; Cobbett 2000; Pistocchi *et al.* 2000) y bioacumulación en vacuolas e inclusiones intracitoplasmáticas e intranucleares (Nassiri *et al.* 1997; Pistocchi *et al.* 1997). Estas respuestas de las células algales también determinan una modificación de la biodisponibilidad y de la toxicidad del metal. Entonces, en los estudios de toxicidad, habrá que considerar tanto los efectos de las variables ambientales sobre la biodisponibilidad de los metales pesados como iones libres (Khalil 1996), así como los efectos de los mecanismos de respuesta algales.

Por otro lado, debe tenerse en cuenta que la presencia de quelantes en el medio de cultivo (EDTA, ácido nitrilo triacético, citratos, etc.) reduce la toxicidad de los metales. El EDTA está considerado como el quelante más fuerte en su afinidad por los cationes metálicos divalentes. Por eso, su utilización en los bioensayos algales es bastante controvertida (Lam *et al.* 1999), ya que, debido a la formación de complejos metal-EDTA, la inclusión del mismo en el medio de crecimiento puede reducir la disponibilidad de los cationes metálicos libres (El-Naggar y El-Sheek 1998; Lam *et al.* 1999). Si bien se ha demostrado que el EDTA puede disminuir la toxicidad del cobre (Pistocchi *et al.* 1997; Ma *et al.* 2003), también se ha comprobado que forma complejos con ciertos micronutrientes esenciales, como el hierro, incrementando su biodisponibilidad. Por lo tanto, distintos protocolos de realización de bioensayos algales difieren en la especificación del uso de EDTA en los medios de cultivo. United States Environmental Protection Agency (USEPA 1994) recomienda no agregarlo, mientras que Environment Canada (1992), American Society for Testing and Materials (1992) y Geis *et al.* (2000), recomiendan usar EDTA para asegurar un adecuado rendimiento del bioensayo. De

todas maneras, cuando se trabaja con EDTA dentro del medio de cultivo, existe la posibilidad de estimar la concentración del catión divalente libre (Cu^{2+}) en el medio. La determinación experimental más precisa de la concentración de cobre en solución se realiza mediante espectroscopía de absorción atómica. Sin embargo, en medios de cultivo de composición definida, se puede obtener una estimación precisa utilizando programas de computación tales como MINEQL+, el REDEQL2, el HALTFALL y otros (Westall *et al.* 1976; Turner *et al.* 1981).

- Sobre la base de los antecedentes planteados, se estableció como objetivo, en esta sección de la tesis, estudiar la posible utilización de esta especie y alguna de sus propiedades como índice de contaminación ambiental con metales pesados, analizando el efecto de concentraciones subletales de cobre sobre la actividad de una enzima clave del camino metabólico de la clorofila (la UroD, caracterizada en el capítulo II). La importancia de evaluar procesos enzimáticos radica en que las concentraciones subletales de contaminantes pueden no llegar a tener efectos observables sobre el crecimiento de los cultivos, pero, sin embargo, pueden afectar procesos metabólicos vitales, como pasos claves de la biosíntesis de la clorofila.

III. A. 2. MATERIALES Y MÉTODOS

III. A. 2. 1. Estudios del efecto del cobre sobre *C. kessleri*

Se estudió el efecto *in vivo* de concentraciones subletales de cobre sobre la actividad de la enzima UroD de la cepa BAFC CA10 de *C. kessleri* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). Se trabajó con cultivos axénicos en 150 ml de BBM, con el agregado de una fuente orgánica de carbono, sometidos a distintas concentraciones del metal. Se ensayaron dos concentraciones distintas de cobre, adicionándolo en el medio como $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Tabla 1). Las concentraciones del metal se seleccionaron sobre la base de los resultados obtenidos en bioensayos preliminares. Los ensayos se realizaron por duplicado, estableciendo como control el medio BBM con acetato de sodio 1‰ (p/v) como fuente orgánica de carbono sin adicionar cobre extra, mientras que los tratamientos fueron realizados adicionando 17,4 mg/l y 34,8 mg/l de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Cu_1 y Cu_2 , respectivamente). En la Tabla 1 se especifica la concentración de cobre libre efectivamente presente en los controles y en cada uno de los tratamientos, estimada mediante el programa MINEQL+ (Versión 3.01).

Tabla 1. Concentración de cobre en los medios de cultivo y estimación de su concentración como catión divalente libre $[\text{Cu}^{2+}]$ en solución al alcanzarse el equilibrio.

Cultivo	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (mg/l)	Cobre en el medio (mg/l)	(μM)	$[\text{Cu}^{2+}]$ (μM)
Control	–	0,4	6,3	$4,5 \cdot 10^{-6}$
Cu_1	17,4	6,9	110,1	$2,6 \cdot 10^{-3}$
Cu_2	34,8	13,4	211	12

Los cultivos se iniciaron inoculando aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células/ml y se incubaron por 72 hs. en un agitador orbital (210 rpm) a $23 \pm 1^\circ \text{C}$ bajo luz continua ($80 \mu\text{mol fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Luego de 72 hs de incubación, se procedió a la preparación de los extractos enzimáticos y se determinó la actividad de la enzima UroD en sobrenadantes de homogenato provenientes de

cultivos controles y de cultivos tratados con cobre. Paralelamente, se estimó el crecimiento por recuento celular en cámara de Neubauer, la tasa de crecimiento diario (μ) y el contenido de clorofila *a* (según se describe en los ítems II.2.1 y II.2.2 del capítulo II) en todos los cultivos.

III. A. 2. 2. Extractos enzimáticos

Los extractos enzimáticos (sobrenadantes de homogenato) de los cultivos controles y de los tratados con 17,4 mg/l de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Cu_1), se prepararon de acuerdo a lo descrito en el ítem II.2.2 del Capítulo II. Antes de la cosecha para la preparación de los extractos enzimáticos, se tomaron alícuotas de los cultivos, para estimar su biomasa por determinación del contenido de clorofila *a* y recuento celular en cámara de Neubauer, de acuerdo a lo especificado en los ítems II.2.1 y II.2.2 del Capítulo II.

III. A. 2. 3. Determinación de la actividad UroD

Los sobrenadantes de homogenato provenientes de los cultivos controles y tratados, fueron utilizados como fuente enzimática para la determinación de actividad UroD, según lo especificado en el ítem II.2.3.2 del Capítulo II. La mezcla estándar de incubación contenía, en un volumen final de 1,5 ml: la muestra enzimática (0,1-0,17 mg de proteínas/ml), Urogen III en una concentración suficiente como para obtener una relación sustrato/proteínas de 20 nmol Urogen/mg proteínas, GSH 1 mM y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,1 mM, en buffer fosfato 0,067 M pH 6,5. Las incubaciones se llevaron a cabo en oscuridad y en anaerobiosis, con agitación mecánica, a 37° C por 20 minutos. En todos los casos se realizaron blancos a tiempo cero. La reacción se detuvo con HCl concentrado hasta una concentración final de 5 % (p/v). Los productos de decarboxilación formados durante la reacción y el sustrato remanente se separaron y cuantificaron como porfirinas metil ésteres por HPLC, de acuerdo a lo especificado en el ítem II.2.3.1 del capítulo II.

La actividad UroD se expresó como nmol de Urogen III decarboxilado/mg proteínas/h (primera etapa) o como nmol de Coprogen III producido/mg proteínas/h (segunda etapa).

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (1976), usando seroalbúmina bovina como estándar.

Los ensayos se repitieron dos veces por duplicado y los resultados se expresaron como la media \pm DS.

III. A. 2. 4. *Análisis estadístico*

Las comparaciones entre tratamientos fueron realizadas mediante análisis de la varianza de una vía (modelo I, factor fijo) (Sokal y Rohlf 1995). La suposición de homocedacea se comprobó mediante la prueba de Bartlett (Steel y Torrie 1986). En uno de los casos (comparación de la actividad de la segunda etapa), en el cual no se cumplía la suposición de homocedacea, se utilizó la prueba no paramétrica por rangos de Kruskal-Wallis (Daniel 1978).

III. A. 3. RESULTADOS

Como se describe a continuación, los bioensayos realizados mostraron que el cobre ejerce un efecto tóxico sobre los cultivos de *C. kessleri*, afectando el contenido de clorofila *a* y la actividad de la UroD.

En los bioensayos de toxicidad de metales pesados normalmente se evita la adición de quelantes al medio de cultivo (Kaplan *et al.* 1987; USEPA 1994). Sin embargo, en bioensayos preliminares realizados en medio carente de EDTA, la cepa mostró un crecimiento mucho menor al esperado en los controles, llegando incluso a observarse que las células de los cultivos adicionados con cobre presentaban un aspecto más saludable. Esto puede deberse a que los quelantes en los medios de cultivo contribuyen a mantener en solución las sales poco solubles de micronutrientes esenciales como el hierro y el cobre (Wood 1974). Dada la posibilidad de estimar la concentración de catión libre mediante el programa MINEQL+ (Versión 3.01), se optó por incluir EDTA en los medios de cultivo a fin de eliminar la variabilidad adicional debida a la deficiencia de minerales esenciales. Por otra parte, se reemplazó la glucosa por acetato de sodio como fuente de carbono orgánico para contar con una fuente orgánica de carbono que permitiera el cálculo de la concentración de cobre libre y un incremento de biomasa que rindiera extractos enzimáticos apropiados para las determinaciones de actividad enzimática.

Las estimaciones del crecimiento de los cultivos, luego de 72 hs. de incubación en las condiciones expuestas en el ítem III.A.2.1 de Materiales y Métodos, mostraron que no hubo mayores diferencias en el número de células/ml alcanzado en los cultivos controles y en los cultivos tratados con cobre (Tabla 2), encontrándose una tasa de crecimiento similar en todos ellos ($p > 0,05$). Sin embargo, el contenido de clorofila *a* de los cultivos tratados con cobre fue significativamente menor ($p < 0,05$), representando un 50-60% del valor control, tanto al expresarlo en $\mu\text{g/ml}$ como en $\mu\text{g}/10^6$ células (Tabla 2 y Figura 1).

Tabla 2. Efecto del cobre sobre la biomasa y el crecimiento de los cultivos de *C. kessleri*

Cultivo	N_f (N° cél./ml $\times 10^6$)	Tasa crecimiento (μ)	Clorofila <i>a</i> ($\mu\text{g/ml}$)	Clorofila por célula (μg clorofila / 10^6 células)
Control	$17,63 \pm 1,37$	$0,85 \pm 0,025$	$10,02 \pm 1,13$	$0,57 \pm 0,06$
Cu ₁	$16,8 \pm 1,33$	$0,84 \pm 0,027$	$5,02 \pm 0,60^*$	$0,30 \pm 0,03^*$
Cu ₂	$14,9 \pm 0,60$	$0,80 \pm 0,014$	$4,93 \pm 0,40^*$	$0,33 \pm 0,03^*$

Los ensayos y las estimaciones de las distintas variables fueron realizados de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como la media \pm DS. Número inicial de células (Ni) = $1,36 \times 10^6$ cél./ml. N_f = número final de células. Tasa de crecimiento (μ) = $(\ln N_f - \ln N_i) / \text{día}$. * $p < 0,05$.

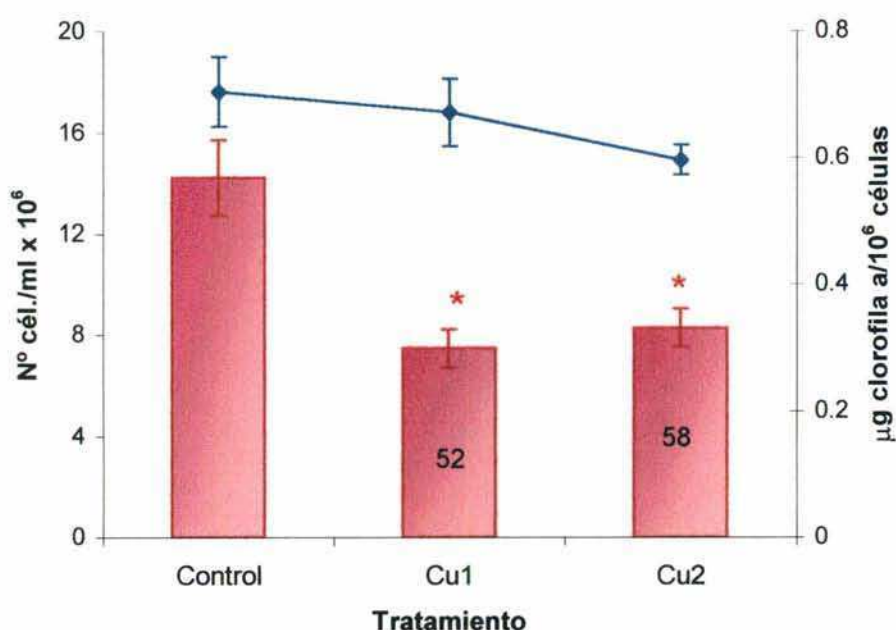


Figura 1. Número de células (—♦—) y contenido de clorofila *a* por célula (■) en los cultivos controles y en los cultivos tratados con 17,4 mg/l (Cu₁) y 34,8 mg/l (Cu₂) de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Los ensayos y las estimaciones fueron realizados de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como la media \pm DS. Los números en las barras indican el porcentaje de clorofila *a* por célula con respecto al control. * $p < 0,05$.

Dado que los cultivos tratados con cobre mostraron una disminución similar en el contenido de clorofila *a*, se decidió probar el efecto sobre la actividad de la quinta enzima de su camino biosintético (UroD), con la menor concentración de cobre ensayada. Los cultivos expuestos durante tres días a 17,4 mg/l de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ mostraron una actividad UroD ($4,84 \pm 0,05$ nmol porfirinas/mg proteínas/h y 0 nmol porfirinas/mg proteínas/h para la primera y segunda etapa, respectivamente) menor que sus controles ($8,79 \pm 1,16$ nmol porfirinas/mg proteínas/h y $2,27 \pm 0,75$ nmol porfirinas/mg proteínas/h para la primera y segunda etapa, respectivamente) (Figura 2). Así, en los cultivos tratados con cobre, la actividad de la segunda etapa disminuyó significativamente con respecto al control ($p < 0,05$), ya que no se observó actividad detectable, lo cual representa un 100% de inhibición. La comparación estadística de las actividades de la primera etapa, en presencia y ausencia de cobre, no arrojó diferencias significativas debido a la alta variabilidad de los resultados, sin embargo se observa una clara tendencia de disminución de esta actividad, la cual equivale a un porcentaje de inhibición del 45%.

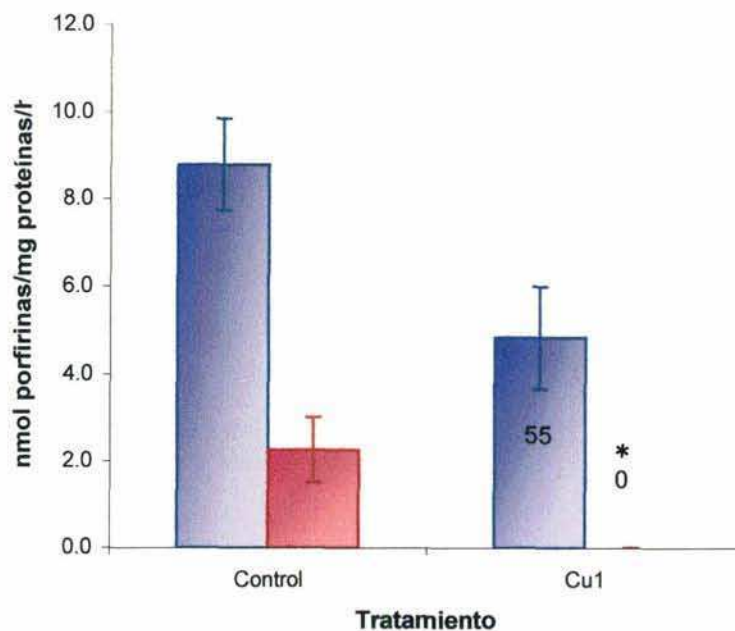


Figura 2. Actividad específica UroD de los cultivos controles y de los cultivos tratados con 17,4 mg/l de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Cu1). Los ensayos fueron realizados como se describe en Materiales y Métodos, usando sobrenadante de homogenato como fuente enzimática y Urogen III como sustrato (relación sustrato/proteínas = 20 nmol Urogen III/mg proteínas). La actividad específica de la primera etapa (■) y de la segunda etapa (■) se expresa como la media \pm DS. Los números en las barras indican el porcentaje de actividad con respecto al control.

III. A. 4. DISCUSION

En esta sección del capítulo III, se estudió el efecto *in vivo* de concentraciones subletales de cobre. Los resultados obtenidos, al analizar el crecimiento, el contenido de clorofila *a* y la actividad de la enzima UroD de la cepa BAFC CA10 de *Chlorella kessleri*, mostraron que este metal pesado ejerce un efecto tóxico sobre los cultivos, afectando principalmente el contenido de clorofila *a* y la actividad de la UroD.

La exposición de los cultivos de la cepa BAFC CA10 de *Chlorella kessleri* a concentraciones subletales de cobre, no tuvo efectos significativos sobre su crecimiento y biomasa celular (Tabla 2 y Figura 1). Pese a observarse una disminución del contenido de clorofila *a*, la tasa de crecimiento en los cultivos tratados con cobre se mantuvo en valores similares a la de los cultivos controles, aún con la concentración de cobre más elevada (211 μM de cobre total, 12 μM de catión divalente libre).

Distintos autores han evaluado el efecto del cobre sobre el crecimiento de diferentes especies del género *Chlorella*. En general, la mayoría de estos bioensayos de toxicidad estudian la disminución de la tasa de crecimiento (tasa de división celular) o de biomasa celular final (rendimiento celular) después de 48 hs – 96 hs. de exposición a concentraciones crecientes del metal (Franklin *et al.* 2000) para calcular las CI_{70} o CI_{50} , concentraciones que inhiben el crecimiento en un 70% o 50% (Nyholm y Källqvist 1989; Wong *et al.* 1995). Como se puntualizara en la Introducción, la toxicidad del cobre depende de la concentración del catión divalente libre (Cu^{2+}), y no de la concentración total del metal, lo que dificulta la comparación entre distintos estudios. Si bien es difícil comparar los resultados obtenidos aquí con los de otros autores, debido a diferencias en las condiciones de bioensayo y a que generalmente sólo se tiene en cuenta la concentración total de cobre en el medio, la cepa de *C. kessleri* aquí estudiada parecería tolerar concentraciones de cobre mucho más altas (13,4 mg/l = 211 μM de cobre en el medio que equivale a 12 μM de Cu^{2+} libre) que las informadas para distintas cepas del género *Chlorella* (Tabla 3).

Tabla 3. Concentraciones de cobre (como cobre total en el medio de cultivo), informadas en la bibliografía, que inhiben el crecimiento de distintas especies del género *Chlorella* en un 50% (CI₅₀).

Especie	CI ₅₀		Referencia
	(mg/l)	(μM)	
<i>Chlorella sn</i>	0.0084*	0.13*	Franklin <i>et al.</i> 1998
	0,016*	0,25*	Franklin <i>et al.</i> 2002
	0,035*	0,55*	Franklin <i>et al.</i> 2000
	1,9	30	Wu <i>et al.</i> 1995
	10	157,5	Agrawal y Kumar 1978
<i>Chlorella fusca</i>	0,03*	0,47*	Soeder <i>et al.</i> 1967
	1,27	20	Kessler 1986
<i>Chlorella kessleri</i>	1,27	20	Kessler 1986
	0,31	4,9	Rojičková-Padrťová y Maršalek 1999
<i>Chlorella protothecoides</i>	0,016*	0,25*	Stauber y Florence 1989
	0,2*	3,15*	Stauber y Florence 1989
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	0,05	0,79	Satuber y Florence 1987
	0,068*	1,07*	Yan y Pan 2002
<i>C. saccharophila</i>	1,27	20	Kessler 1986
<i>C. sorokiniana</i>	1,27	20	Kessler 1986
<i>Chlorella vulgaris</i>	4,83	76	Lam <i>et al.</i> 1999
	2	31,5	Rai <i>et al.</i> 1996

* Ausencia de EDTA en el medio de cultivo

Como se dijo anteriormente, en los estudios de toxicidad, deben considerarse tanto los factores ambientales (Khalil 1996), como los mecanismos de respuesta algales, que pueden afectar la biodisponibilidad de los metales pesados como iones libres (Xue *et al.* 1996; Ma *et al.* 2003). Entre los factores atenuantes de la toxicidad del cobre y de los metales pesados en general, que deben tenerse en cuenta, se encuentran la presencia de EDTA y de quelantes orgánicos en el medio de cultivo y el tamaño del inóculo inicial del bioensayo. En los trabajos que figuran en la

Tabla 3, los medios de cultivo corresponden tanto a medios minerales sin quelante como a medios conteniendo únicamente EDTA como quelante, mientras que en el estudio realizado aquí, el medio además contiene acetato de sodio. Tanto en otras algas (Farrel *et al.* 1990; El-Naggard *et al.* 1998), como en la especie aquí estudiada (Schiariti *et al.* 2003), se ha demostrado que el acetato y la glucosa atenúan los efectos del cobre debido a su capacidad de quelar metales. Por lo que la tolerancia a concentraciones más altas de cobre total que se encontró en esta cepa de *C. kessleri* podría deberse, en parte, a la menor concentración de Cu^{2+} libre en los medios de cultivo utilizados en los bioensayos. Sin embargo, a pesar de la presencia de quelantes en el medio, la concentración de Cu^{2+} libre ($12 \mu\text{M}$, calculada mediante el programa MINEQL) en los bioensayos aquí realizados con *C. kessleri* (en presencia de EDTA y de acetato de sodio), resulta ser más alta que las concentraciones de cobre total informadas en los otros trabajos (* en Tabla 3). Entonces, puede decirse que esta cepa, efectivamente, presentaría una tolerancia mayor a la de las especies estudiadas por otros autores, lo cual podría representar una ventaja si se desea utilizarla en procesos de biorremediación. En cuanto al tamaño del inóculo de partida, la mayoría de los protocolos de los bioensayos algales recomiendan una densidad celular inicial de 10^4 a 10^5 células/ml, como un compromiso entre maximizar la sensibilidad del bioensayo y tener suficientes células como para poder determinar los cambios en la densidad celular durante la duración del mismo (Stauber 1995). A pesar de que existen evidencias de que la sensibilidad a un tóxico disminuye con el aumento de la densidad celular inicial (Straton y Giles 1990; Moreno-Garrido *et al.* 2000; Franklin *et al.* 2002), Wong y Couture (1986) y más recientemente Blaise y Ménard (1998) recomendaron un inóculo algal de 10^5 y 10^6 células/ml, respectivamente. En este caso, debido a la necesidad de contar con una biomasa considerable que permitiera la determinación de la actividad de la enzima UroD, el inóculo inicial fue de aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células/ml. Como las células se dividen diariamente, la biomasa final alcanzada es aún más alta y puede llevar a la adsorción del metal a una mayor superficie total de paredes celulares, disminuyendo la biodisponibilidad para cada célula en particular. Además, se sabe que muchas algas, como mecanismo de respuesta a la presencia de distintos metales, liberan al medio compuestos extracelulares quelantes (Lombardi y Vieira 2000; Macfie y Welbourn 2000; Pistocchi *et al.* 2000; Rijstenbil y Gerringa 2002). Por lo tanto, el aumento de la producción de exudados por un mayor número de células, también puede influir en la biodisponibilidad al variar la especiación química del cobre por la formación de complejos exudado-Cu, no tóxicos

(González Dávila *et al.* 1995). Todo ello también puede explicar las diferencias con los resultados observados en otras especies de *Chlorella*.

Como se señaló anteriormente, tampoco pueden descartarse los factores intrínsecos de la especie algal, como son los mecanismos de detoxificación y de exclusión (Ma *et al.* 2003). Se sabe que ciertas especies algales son más tolerantes a los contaminantes que otras y aún diferentes cepas de la misma especie pueden reaccionar en forma distinta debido a diferencias genéticas (Prasad *et al.* 1998; Baos *et al.* 2002). En esta cepa en particular, la pared celular es rica en poli N-acetilglucosamina (ver capítulo I), lo que determina una abundancia de grupos acetilo que constituyen sitios de unión para los metales y pueden conferirle una mayor protección extracelular. Además, como se ha informado para otras algas e incluso para otra cepa de *C. kessleri* (Maršalek y Rojičová-Padrtová 1996; Prasad *et al.* 1998), tampoco puede descartarse en esta cepa, la posibilidad de la existencia de un mecanismo de exclusión extracelular por liberación al medio de compuestos quelantes de metales (ácido glicólico, polisacáridos y carbohidratos). Por otra parte, se ha informado que las especies de ambientes ácidos suelen ser más tolerantes a la contaminación por metales (Rai *et al.* 1996). La cepa de *C. kessleri* estudiada aquí, proviene de un ambiente termal, en el cual soporta condiciones extremas que incluyen un pH muy ácido (2,5-3), altas concentraciones salinas, temperaturas de hasta 35°C y alta irradiación (ítem I.2.1. del Capítulo I), por lo que podría esperarse cierto grado de resistencia que explicaría, en parte, su mayor tolerancia al cobre.

Si bien la exposición a concentraciones subletales de cobre puede no tener efectos observables sobre el crecimiento, pueden estar afectados procesos metabólicos esenciales. En este caso, pudo observarse un efecto sobre el contenido de clorofila *a*, el cual disminuyó entre un 50% y 60% en los cultivos tratados con las dos concentraciones de cobre (Tabla 2 y Figura 1). La disminución del contenido de clorofila o clorosis es uno de los efectos más comunes de la exposición a concentraciones subletales de cobre (Rama Devi y Prasad 1998; Gonzales *et al.* 1998). Ello puede deberse tanto a una interferencia en la síntesis de clorofila (Lam *et al.* 1999), como a la desorganización de las membranas del cloroplasto y destrucción de ese compuesto, debidos a procesos de peroxidación lipídica desencadenados por la generación de especies reactivas de oxígeno por parte del Cu^{2+} (Rama Devi y Prasad 1998; Babu *et al.* 2002 Rijstenbil y Gerringa 2002). Además, la inhibición de la síntesis de clorofila por cobre puede llevar a una

acumulación de sus precursores. Como estos compuestos son altamente fotooxidables (Mock *et al.* 1998), generan especies reactivas de oxígeno por absorción de energía lumínica (Hu *et al.* 1998) y, por lo tanto, pueden provocar un aumento adicional de los procesos de peroxidación. Sin embargo, en un trabajo paralelo, llevado a cabo con la misma especie expuesta a las mismas condiciones aquí estudiadas, se encontró que la disminución de clorofila *a* con concentraciones crecientes de cobre no estaba acompañada por un aumento de la peroxidación lipídica (Schiariti *et al.* 2003). Ello parece indicar que, en esta cepa, la inhibición de la síntesis de clorofila por presencia de cobre, sería la principal implicada en la disminución de su contenido. Tomando en cuenta los resultados de ambos estudios, no puede descartarse la posibilidad de que, en esta cepa, existan mecanismos celulares más eficientes para la captura de los radicales libres generados por la presencia del metal. Además, como ha sido demostrado para otras algas y para distintas especies del género *Chlorella*, las células algales pueden responder a la presencia del metal produciendo polifosfatos y proteínas tales como metalotioneínas o fitoquelatinas que acomplejan metales y disminuyen la concentración de catión libre en el medio intracelular (Knauer *et al.* 1997; Wu *et al.* 1998; Gledhill *et al.* 1999; Tam *et al.* 2001). La determinación de cuál es el mecanismo de detoxificación realmente predominante en esta cepa, requerirá estudios experimentales posteriores, como determinaciones de los niveles intracelulares de proteínas quelantes, de la actividad de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa, etc.) y de la producción de compuestos antioxidantes de bajo peso molecular (ascorbato, glutatión, carotenoides y fenoles).

Los resultados observados al analizar el contenido de clorofila *a* de los cultivos tratados con cobre, concuerdan con los resultados específicamente obtenidos al analizar el efecto de este metal sobre la actividad de la quinta enzima del camino biosintético de la clorofila (UroD). Las determinaciones de la actividad de la enzima UroD proveniente de cultivos tratados (Figura 2), mostraron un porcentaje de inhibición (45%) que correlaciona con el porcentaje de disminución de clorofila *a* detectado (50%). Por lo tanto, puede decirse que en esta cepa de *C. kessleri*, la disminución del contenido de clorofila *a* puede deberse, principalmente, al efecto inhibitorio del cobre sobre el camino de síntesis de ese compuesto.

Se ha informado que la UroD es inhibida por una amplia variedad de compuestos, incluyendo metales pesados, siendo el Cu^{2+} uno de los iones metálicos más poderosos en inhibir su actividad (Koopmann y Batlle 1987; Jones y Jordan 1993; Chaufan *et al.* 2001). Como se especificara en el capítulo anterior, no existen trabajos previos a esta tesis sobre la UroD de especies del género *Chlorella* o de alguna Chlorophyta. Inclusive, el único trabajo realizado en algas fue la caracterización de la UroD de *Euglena gracilis* (Euglenophyta) realizada por Juknat *et al.* (1989). Por lo tanto, tampoco existen datos de la influencia de metales sobre la actividad de esta enzima proveniente de fuentes algales. Uno de los efectos tóxicos informados para este metal es, precisamente, la inhibición de ciertas enzimas, por bloquear o interferir con sus sitios activos al unirse con los grupos sulfhidrilos o tioles (Lam *et al.* 1999; Rijstenbil y Gerringa 2002), e incluso se ha demostrado que puede unirse a fitoquelatinas (proteínas quelantes de metales) que poseen al menos dos residuos de cisteína (Ahner *et al.* 1995). La UroD es una proteína ácida con carga neta negativa a pH neutro y con una alta afinidad por cargas positivas (Straka y Kushner 1983). En su sitio activo presenta grupos sulfhidrilos, estando implicados, además, residuos de cisteína e histidina (Koopmann y Batlle 1987; Jones y Jordan 1993, Mock *et al.* 1995; Chaufan *et al.* 2001). La presencia de estos grupos es importante para su actividad enzimática y se ha demostrado que la modificación de ellos inactiva la UroD de la bacteria fotosintética *Rhodobacter sphaeroides* (Jones y Jordan 1993). Por lo tanto, la inhibición de la actividad de esta enzima, detectada específicamente aquí para *C. kessleri*, puede ser ejercida por la capacidad de este catión de asociarse a los grupos sulfhidrilos implicados en su sitio activo.

Los resultados obtenidos con esta cepa de *C. kessleri* (Figura 2), mostraron una clara inhibición de la actividad UroD (45% para la primera etapa y 100% para la segunda etapa) con una concentración efectiva de Cu^{2+} en el medio muy baja ($2,6 \times 10^{-3} \mu\text{M}$). Se ha informado que el cobre inhibe, principalmente, la conversión de uroporfirinógeno en heptacarboxiporfirinógeno (Straka y Kushner 1983), disminuyendo por lo tanto la formación de este último, lo cual podría explicar la inhibición del 100% observada en la actividad de la segunda etapa de la UroD de *C. kessleri* expuesta a esa concentración de cobre. Dado que no se observaron efectos letales durante el período de los bioensayos, es probable que el *pool* previo de clorofila y/o la cantidad sintetizada, aunque baja, fueran suficientes para que las funciones esenciales pudieran continuar realizándose en presencia de una fuente adicional de

carbono orgánico y, de esa manera, que los cultivos pudieran sobrevivir el corto tiempo ensayado.

Hasta el momento, sólo existen antecedentes de estudios *in vitro* sobre el efecto del cobre en la actividad UroD. Koopmann y Batlle (1987) informaron una inhibición mayor al 95% en la actividad UroD de *Rhodopseudomonas palustris*, con 1 mM de Cu^{2+} ; Jones y Jordan (1993) informaron una inhibición del 43% en la actividad UroD de la bacteria fotosintética *Rhodobacter sphaeroides*, con 1mM de Cu^{2+} ; Chaufan *et al.* (2001) informaron una inhibición del 14%, 90% y 95% en la actividad UroD de hígado de rata, con concentraciones 2,5 μM , 3 μM y 100 μM de Cu^{2+} , respectivamente. En los trabajos mencionados estudiaron el efecto *in vitro* sobre la UroD, expuesta a la acción directa del tóxico, mientras que los cultivos aquí estudiados fueron expuestos *in vivo*. La diferencia entre los resultados de estos dos tipos de ensayos, se deben principalmente a que la exposición directa de la enzima al Cu^{2+} en los ensayos *in vitro*, excluye los mecanismos de defensa y detoxificación de la célula que, incluso, pueden disminuir aún más la concentración a la que efectivamente está expuesta la UroD en los ensayos *in vivo*. Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis demuestran la importancia de realizar ensayos *in vivo*, en los que el efecto del metal no sólo estaría asociado con su acción directa sobre la enzima, sino también con los procesos nocivos desencadenados a nivel celular por el mismo (como desestabilización de membranas y generación de radicales libres) que pueden contribuir al aumento de su acción inhibitoria sobre la enzima ensayada. Este estudio muestra, también, que dosis de cobre aparentemente no tóxicas a nivel de crecimiento pueden tener efectos dañinos a nivel del metabolismo celular. En ese sentido, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la determinación de la actividad de la enzima UroD podría constituir un biomarcador de la toxicidad de niveles de cobre que no alcanzan a producir efectos ponderables sobre el crecimiento algal.

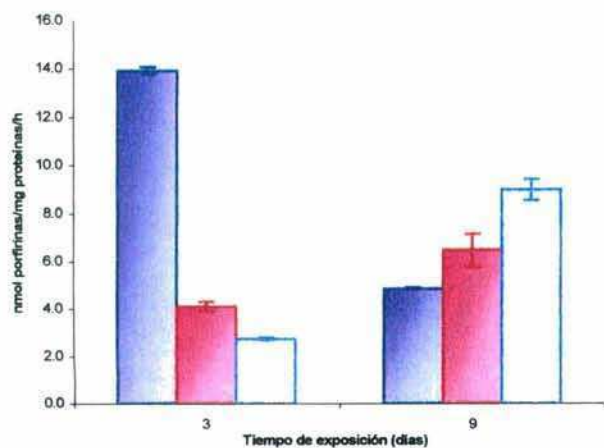
Por otra parte, también se observa que los organismos (en este caso una microalga) pueden sufrir daños a nivel metabólico con concentraciones de cobre (6,9 mg/l = 110 μM) que son cercanas a los valores de máxima descarga diaria de cobre permitida para la industria (principalmente de fundición) en países desarrollados como Estados Unidos (3 a 4,5 mg/l; USEPA 2002a) y que son más bajos que los valores residuales detectados en algunos efluentes industriales luego de su tratamiento (330 μM ; McLarnon-Riches *et al.* 1998). Esto pone de

manifiesto la complejidad del establecimiento de normas de manejo industrial y de calidad de aguas. Estos criterios determinan la concentración de cobre, independientemente de la concentración efectiva de Cu^{2+} libre asociada a ella, y debe tenerse en cuenta que los organismos, en realidad, pueden estar expuestos a concentraciones de catión divalente libre más altas o más bajas en función de las diferentes condiciones del ambiente acuático y que, además, los metales pueden acumularse en ellos, magnificando su concentración intracelular (bioconcentración o biomagnificación) y por ende la exposición de las enzimas implicadas en los diversos caminos metabólicos (Moore y Ramamoorthy 1984; Pistocchi *et al.* 1997; Macfie y Welbourn 2000; Tam *et al.* 2001; Franklin *et al.* 2002; Yan y Pan 2002; Ma *et al.* 2003).

III. A. 5. CONCLUSIONES

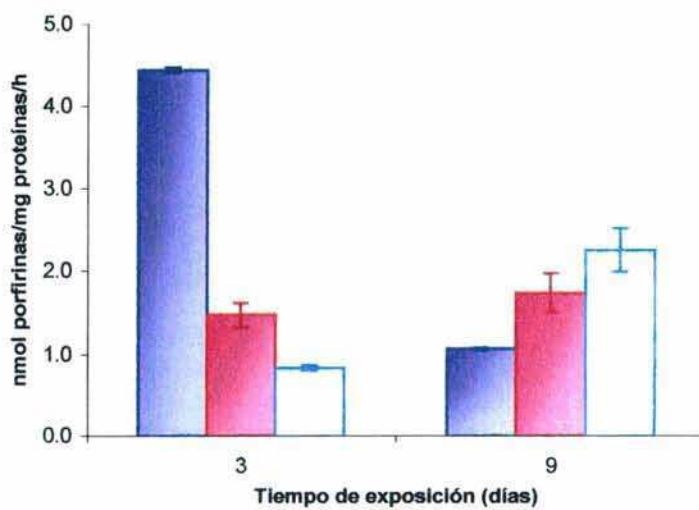
En esta sección se presentaron los resultados obtenidos al estudiar el efecto de concentraciones subletales de cobre sobre los cultivos de la cepa BAFC CA10 de *C. kessleri*. Dichos resultados demuestran la factibilidad del uso de *C. kessleri* en estudios de contaminación y, en base a ellos, puede concluirse que:

- ❖ Concentraciones de cobre aparentemente no tóxicas a nivel del crecimiento, pueden tener efectos nocivos a nivel del metabolismo celular, en este caso demostrado específicamente por su acción inhibitoria sobre la enzima UroD.
- ❖ Las concentraciones de cobre, ensayadas en este estudio, inhiben en un 45% la actividad de la UroD de esta cepa, quinta enzima del camino biosintético de la clorofila.
- ❖ En la disminución del contenido de clorofila *a*, observada en esta cepa expuesta a las concentraciones de cobre ensayadas, está implicado un efecto inhibitorio sobre una enzima clave de su camino biosintético.
- ❖ Esta cepa de *C. kessleri* toleraría concentraciones de cobre más elevadas que las informadas para otras especies del género *Chlorella*. Ello podría indicar la existencia de un mecanismo de detoxificación más eficiente. El análisis de esto último requerirá estudios posteriores, como determinación de los niveles intracelulares de proteínas quelantes, de la actividad de enzimas antioxidantes (catalasa, superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa, etc.) y de la producción de compuestos antioxidantes (ascorbato, glutatión, carotenoides, fenoles).
- ❖ La determinación de la actividad UroD podría constituir un biomarcador de la toxicidad de niveles de cobre (y/u otros metales pesados) que no alcanzan a producir efectos ponderables sobre el crecimiento algal. En relación con esto, podría proponerse una modificación de los criterios de determinación de los niveles de descarga máxima permitida para estos contaminantes en efluentes industriales, de manera que involucren marcadores del metabolismo celular.



III. SECCIÓN B

BIOENSAYOS DE TOXICIDAD DE XENOBIÓTICOS



III. B. 1. INTRODUCCIÓN

Otro problema importante en la actualidad, es la contaminación de los cuerpos de agua por compuestos orgánicos, extremadamente tóxicos para las microalgas, como herbicidas, pesticidas, hidrocarburos del petróleo e hidrocarburos aromáticos polihalogenados (HAPs) que incluyen los hidrocarburos policlorinados. Los HAPs ingresan en los ecosistemas acuáticos por diferentes fuentes (por ej. pesticidas y actividad de industrias químicas) y pueden persistir en ellos por varios años (Gómez-Catalán *et al.* 1993; Muñoz *et al.* 1996). En el mundo, se fabrican alrededor de 11.000 compuestos organoclorados, lo que implica la liberación de miles de subproductos más. Por ejemplo: durante la manufactura, uso y eliminación de una amplia gama de productos comerciales como pesticidas, solventes, lubricantes, refrigerantes, jabones, desodorantes y cosméticos (Jenkins *et al.* 1993; Costner *et al.* 1995; Michielsen *et al.* 1999), se crean una gran cantidad de subproductos organoclorados tóxicos no deseados (dioxinas, dibenzofuranos, paradióxinas, bifenilos policlorinados, bencenos policlorinados, incluyendo hexaclorobenceno). Además, la potabilización del agua, por cloración, es otra vía de generación de subproductos clorinados. Entre estos compuestos, el hexaclorobenceno (HCB), es uno de los 11 contaminantes orgánicos hidrofóbicos identificados como riesgosos en las listas de la Unión Europea y de la USEPA (Bro-Rasmussen *et al.* 1994; USEPA 1994 y 2002b). Aunque en países como Australia, Alemania, Canadá, Estados Unidos y Argentina se ha prohibido su uso comercial, aún se detectan en ambientes acuáticos, posiblemente provenientes de distintos procesos industriales (Menone *et al.* 2001; Breivik *et al.* 2002; Meijer *et al.* 2003). El HCB se usa como fungicida para el tratamiento de semillas de cereales (principalmente trigo) y es un subproducto de la síntesis de pesticidas (como el Picloram) y herbicidas (como el ácido 2,4 diclorofenoxi acético: 2,4D o DCPA) (Cox 1998). Otras fuentes de emisión de HCB al ambiente, son la incineración de residuos y el proceso de extracción de magnesio (Costner 2000; Breivik *et al.* 2002; Meijer *et al.* 2003). El HCB es tóxico para los organismos acuáticos y terrestres, es persistente y bioacumulable. Si bien tiene una baja solubilidad en agua, puede persistir por mucho tiempo, con una vida media de 6 años en aguas superficiales y de 11 años en aguas profundas (Cox 1998). Como ya se comentara, las algas tienen uno de los roles principales en la acumulación de todo tipo de contaminantes y, específicamente, en la de estos contaminantes hidrofóbicos. Se ha informado que la bioacumulación de HAPs en ellas es muy rápida, por lo que cumplirían el papel principal en la

persistencia y entrada de estos xenobióticos en la cadena alimentaria del ecosistema acuático (Muñoz *et al.* 1996). El fitoplancton puede bioacumular alrededor de 34 tóxicos orgánicos diferentes (Allen-Gil *et al.* 1997). La acumulación de estos contaminantes incluye una adsorción en la superficie celular que, en muchas especies algales, puede incrementarse por tener material extracelular asociado a sus paredes y una absorción hacia el interior celular (Sicko-Goad y Stoermer 1988). De esa manera, las algas acumulan el HCB y éste, como la mayoría de los compuestos organoclorados, tiene una tendencia a biomagnificarse a través de la cadena trófica (Riisgaard y Hansen 1990; Senthilkumar *et al.* 2001; Gray 2002). Por ejemplo, la bioacumulación de HCB en las algas es 570 veces el nivel de exposición y a medida que se asciende en la cadena trófica la acumulación es mucho mayor, encontrándose, cerca del tope (aves acuáticas), a concentraciones 25 millones de veces más altas que en el agua (Allen-Gil *et al.* 1997; Senthilkumar *et al.* 2001). La exposición e ingestión de HCB en humanos y animales daña el hígado, la tiroides, el riñón, el sistema nervioso, el sistema endocrino, el sistema inmune, la reproducción y el desarrollo, y tiene efectos mutagénicos y carcinogénicos. Además, interfiere con enzimas del camino metabólico del hemo y causa la enfermedad Porfiria Cutánea Tarda en humanos y animales de laboratorio (Elder 1998). Particularmente, se sabe que la enzima UroD es inhibida *in vivo* por HAPs, siendo éste el punto clave de su acción tóxica (Elder 1998; Chaufan *et al.* 2001). Como se especificara en el capítulo anterior, esta enzima es una de las enzimas regulatorias claves del camino metabólico del hemo y de las clorofilas, por lo que resulta relevante comprobar si el HCB, en microalgas, también afecta este importante punto de control metabólico.

Numerosos estudios han demostrado que distintos tóxicos orgánicos, como los herbicidas, HAPs (incluyendo el HCB), hidrocarburos del petróleo, aceites y otros compuestos orgánicos son extremadamente tóxicos para las algas (Muñoz *et al.* 1996; Caux *et al.* 1996; Kong *et al.* 1998; Bérard y Pelte 1999). También se ha demostrado que las algas son capaces de metabolizar o llevar a cabo biotransformaciones sobre los compuestos aromáticos (Tikoo *et al.* 1997; Semple *et al.* 1999; Yang *et al.* 2002) que, aunque no sean completas, son importantes para cambiar su naturaleza química y hacerlos susceptibles al ataque de otros microorganismos que podrían completar su biodegradación (Meulenberg *et al.* 1997). Los efectos tóxicos observados en bioensayos unialgales, incluyen: alteración de la tasa de crecimiento causando una disminución o interrupción del mismo (Tukaj y Bohdanowicz 1995a; Muñoz *et al.* 1996),

aumento del tamaño celular (Tukaj y Bohdanowicz 1995b), disminución de la síntesis de proteínas (El-Sheekh *et al.* 1994; Kong *et al.* 1998) y reducción de la fotosíntesis (Caux *et al.* 1996; Muñoz *et al.* 1996) por desacoplamiento o bloqueo del transporte de electrones (Brack y Frank 1998; Joliot y Joliot 1998; Caux *et al.* 1996), inhibición de la captación de CO₂ (El-Sheekh *et al.* 1994), destrucción de clorofila e inhibición de su síntesis (Sicko-Goad y Stoermer 1988). Se ha reportado que el HCB y otros HAPs inducen estrés oxidativo *in vivo* e *in vitro*, evidenciado por el aumento de la producción de malondialdehído, por el aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa, superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa, glutathion-S-transferasa y glutathion peroxidasa y por el aumento de la producción de compuestos antioxidantes como el GSH y los carotenos (Roy *et al.* 1995; Yang *et al.* 2002; Lei *et al.* 2003). Además, se ha demostrado específicamente, mediante estudios de quimioluminiscencia, que estos contaminantes inducen un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (Bagchi *et al.* 1995) debido a su capacidad de unirse a citocromos y desacoplar el transporte de electrones (Ferioli *et al.* 1984). Por otra parte, los HAPs tienen la capacidad de inducir sistemas enzimáticos que metabolizan xenobióticos (Bagchi *et al.* 1995). Uno de ellos, es el sistema citocromo P₄₅₀, el cual se ha demostrado que está presente en plantas superiores, algunas Clorophyta y otros grupos algales (Pflugmacher y Sandermann 1998; Roy *et al.* 1995) y que se encuentra implicado en la biotransformación de HAPs en *C. sorokiniana* y *C. fusca* (Thies *et al.* 1996). También, como se ha informado para *Selenastrum capricornutum*, en la metabolización de estos compuestos puede intervenir la enzima dioxigenasa (Warshawsky *et al.* 1995; Semple *et al.* 1999) o la enzima glutathion-S-transferasa (Tang *et al.* 1998). Estos mecanismos de metabolización, implican la formación de productos intermediarios (algunos de los cuales pueden ser aún más tóxicos que el compuesto parental) para llegar a producir compuestos más solubles que puedan ser inmovilizados por conjugación con ácido glucurónico o con glucosa (Warshawsky *et al.* 1995; Semple *et al.* 1999), o que puedan ser eliminados de la célula más fácilmente.

- Sobre la base de los antecedentes planteados, se estableció como objetivo, en esta sección de la tesis, estudiar la posible utilización de esta especie y alguna de sus propiedades como índice de contaminación ambiental con xenobióticos, evaluando el efecto del HCB sobre el crecimiento y sobre la actividad de una enzima clave del camino metabólico de la clorofila (UroD, caracterizada en el capítulo II).

III. B. 2. MATERIALES Y MÉTODOS

III. B. 2. 1. *Estudios del efecto del HCB sobre C. kessleri*

Se estudió el efecto *in vivo* del HCB sobre el crecimiento algal y la actividad de la enzima UroD de la cepa BAFC CA10 de *C. kessleri*. Se trabajó con cultivos axénicos en 150 ml de BBM con el agregado de una fuente orgánica de carbono, sometidos a distintas concentraciones del contaminante, y se determinó la actividad UroD en sobrenadantes de homogenato provenientes de cultivos controles y cultivos tratados con HCB. Para ello, se iniciaron tres cultivos axénicos en medio BBM con glucosa 1‰ (p/v) como fuente orgánica de carbono, inoculando $1,5 \times 10^6$ células/ml e incubándolos bajo condiciones estándar. A los tres días de crecimiento, a uno de los cultivos (HCB+) se le agregó HCB (1mg/l de medio de cultivo), partiendo de una solución madre de 1g HCB/l de MeOH (Muñoz *et al.* 1996), a otro (MeOH+) se le agregó MeOH 0,1 % (v/v) y el restante (control) continuó creciendo en medio normal. A los seis y a los doce días totales de crecimiento (tres y nueve días de exposición al HCB y/o al metanol), se procedió a la preparación de los extractos enzimáticos a partir de los cultivos controles y tratados, para determinar la actividad UroD. El bioensayo se realizó por duplicado y, paralelamente, se estimó el crecimiento por recuento celular en cámara de Neubauer, la tasa de crecimiento diario (μ) y el contenido de clorofila *a* y de carotenos totales, a los tres, seis y doce días de crecimiento de cada cultivo (según la metodología descrita en los ítems II.2.1 y II.2.2 del capítulo II). La estimación del contenido de carotenos totales, se realizó de acuerdo a Lichtenthaler (1987).

III. B. 2. 2. *Extractos enzimáticos*

Los extractos enzimáticos (sobrenadantes de homogenato) de los cultivos controles y tratados con metanol y HCB, se prepararon de acuerdo a lo descrito en el ítem II.2.2 del Capítulo II. Antes de la cosecha para la preparación de los extractos enzimáticos, se tomaron alícuotas de los cultivos, para estimar su biomasa por determinación del contenido de clorofila *a* y recuento celular en cámara de Neubauer, de acuerdo a lo especificado en los ítems II.2.1 y II.2.2 del Capítulo II.

III. B. 2. 3. *Determinación de la actividad UroD*

Los sobrenadantes de homogenato provenientes de los cultivos controles y tratados, fueron utilizados como fuente enzimática para la determinación de actividad UroD, según lo especificado en el ítem II.2.3.2 del Capítulo II. La actividad UroD se determinó de la misma forma que en la sección A (ítem III.A.2.3).

III. B. 2. 4. *Análisis estadístico*

Las comparaciones entre tratamientos y tiempos de exposición fueron realizadas mediante análisis de la varianza de dos vías (clasificación múltiple, ambos factores fijos) (Steel y Torrie 1986). En aquellos casos en los cuales la interacción entre factores era significativa, se realizó un análisis de efectos simples (Sokal y Rohlf 1995). Para cada tiempo, se realizaron comparaciones entre el tratamiento y sus correspondientes controles (MeOH+ vs. control, HCB+ vs. control, HCB+ vs. MeOH+), mediante el procedimiento de Dunnett (Steel y Torrie 1986).

III. B. 3. RESULTADOS

Como se describe a continuación, los bioensayos realizados mostraron que el HCB ejerce un efecto tóxico sobre los cultivos de *C. kessleri*, afectando el crecimiento y la actividad de la UroD.

Al analizar el efecto del HCB sobre el crecimiento de *C. kessleri*, se observa que la adición de contaminantes (MeOH y MeOH más HCB) no tuvo efectos sobre el contenido de clorofila (Tabla 1). En cambio, sí se observa un efecto sobre el número de células/ml (Tabla 1 y Figura 1). Los controles siguieron una curva de crecimiento típica de los cultivos en lote, encontrándose, en el momento de determinación de los distintos parámetros, en su fase exponencial (tres y seis días de crecimiento) y en su fase estacionaria (doce días de crecimiento). En los cultivos MeOH +, se observó una disminución de la tasa de crecimiento frente al agregado del contaminante, la cual se mantuvo constante y disminuida hasta el final del bioensayo (Tabla 1). En cambio, los cultivos HCB + mostraron una fuerte caída de la tasa de crecimiento frente al agregado del contaminante durante los tres días posteriores a su adición (Tabla 1), resultando incluso negativa. Sin embargo, durante los seis días subsiguientes se observó una recuperación, con aumento de la tasa a valores superiores a la de los cultivos controles (0,06 vs. 0,01) llegando, al finalizar el bioensayo, a un número de células/ml similar al de estos últimos (Tabla 1 y Figura 1). Además de no observarse una caída del contenido de clorofila *a*, el contenido en carotenos no presentó diferencias significativas, bajo las distintas condiciones ensayadas.

Tabla 1. Contenido de clorofila *a*, contenido de carotenos, y crecimiento de los cultivos de *C. kessleri* sometidos a los distintos tratamientos.

Tratamiento	N _f	clorofila <i>a</i> μg/10 ⁶ cél	carotenos μg/10 ⁶ cél	Tasa de crecimiento (μ)		
				0-3	3-6	6-12
Control (3)	30,98 ± 2,1	0,47 ± 0,033	0,12 ± 0,008	0,99 ± 0,001	0,04 ± 0,012	—
MeOH + (3)	28,18 ± 1,7	0,47 ± 0,028	0,12 ± 0,007	0,98 ± 0,004	0,01 ± 0,000	—
HCB + (3)	25,01 ± 1,3	0,58 ± 0,034	0,14 ± 0,008	0,98 ± 0,002	-0,06 ± 0,009*	—
Control (9)	33,70 ± 2,2	0,41 ± 0,026	0,12 ± 0,008	0,01 ± 0,001		
MeOH + (9)	30,18 ± 1,7	0,51 ± 0,029	0,14 ± 0,008	0,01 ± 0,001*		
HCB + (9)	36,10 ± 2,5	0,47 ± 0,033	0,12 ± 0,009	0,06 ± 0,002*		

N_f: número de células alcanzado en los cultivos (N°células/ml x 10⁶) al cortar el ensayo. El número entre paréntesis indica los días totales de tratamiento. Los cultivos se iniciaron en el día 0 y los agregados (MeOH o HCB) se realizaron al final del tercer día de crecimiento, manteniendo los cultivos tres y nueve días más antes de la cosecha (seis y doce días totales de crecimiento). Se calcularon las tasas de crecimiento de los cultivos antes y después de ser expuestos a los contaminantes. * p < 0,05.

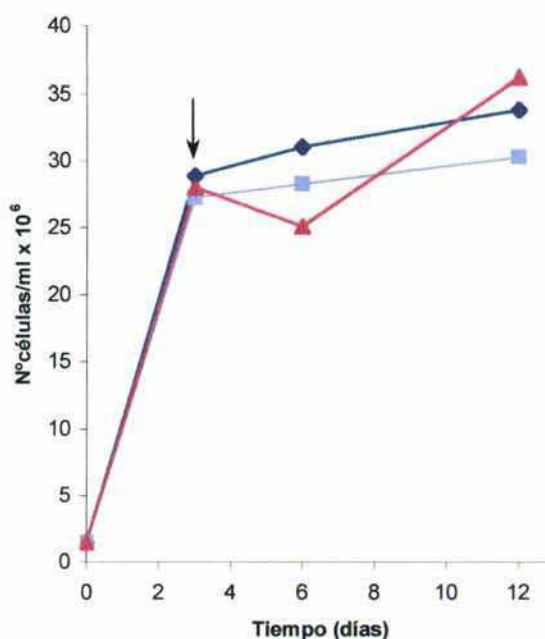


Figura 1. Efecto del HCB y del MeOH sobre el crecimiento de los cultivos de *C. kessleri*. El bioensayo fue realizado como se describe en Materiales y Métodos. El crecimiento de los cultivos Controles (—♦—), y de los cultivos expuestos a MeOH (—■—) o a HCB (—▲—) se expresa como la media del número de células/ml x 10⁶. Por razones de claridad visual, se omitieron las barras de DS (presentes en la tabla 1). La flecha en el área del gráfico indica el momento de adición de la solución metanólica de HCB o del MeOH a los cultivos HCB + y MeOH + respectivamente.

Los resultados de los ensayos de actividad UroD en los cultivos sometidos a la acción del HCB se muestran en las Figuras 2 y 3 y en la Tabla 2. La actividad UroD fue determinada en los sobrenadantes de homogenato provenientes de cultivos cosechados a los seis y a los doce días totales de crecimiento (tres y nueve días de exposición a los contaminantes).

Los cultivos expuestos durante tres días a la acción del HCB, mostraron una actividad UroD significativamente menor que los cultivos controles y que los expuestos únicamente a metanol ($p < 0,05$), observándose una actividad del 66% para la primera etapa y del 58% para la segunda etapa respecto de los cultivos tratados únicamente con metanol y del 20% y del 19% para la primera y segunda etapa, respectivamente, comparada con la de los cultivos controles (Figuras 2 y 3). Por otra parte, los cultivos tratados durante tres días con metanol presentaron una actividad del 30% para la primera y del 33% para la segunda etapa, respecto de los cultivos controles (Figuras 2 y 3). De todas maneras, en los cultivos HCB +, la actividad UroD sufrió una caída adicional, observándose una inhibición del 34% y 42% para la primera y segunda etapa, respectivamente, respecto de los cultivos tratados con metanol (MeOH +) y del 80% y 81% para la primera y segunda etapa, respectivamente, respecto de los cultivos controles (Tabla 2).

En cuanto a los cultivos expuestos durante nueve días, mostraron una actividad UroD significativamente mayor que sus respectivos controles ($p < 0,05$) (Tabla 2 y Figuras 2 y 3). Los cultivos controles de este día presentaron una actividad específica para la primera ($4,85 \pm 0,04$ nmol porfirinas/mg proteínas/h) y para la segunda etapa ($1,08 \pm 0,01$ nmol porfirinas/mg proteína/h) equivalente al 35% y 24%, respectivamente, de la de los cultivos controles de seis días de crecimiento.

Tabla 2. Efecto del metanol (MeOH+) y del HCB (HCB +) sobre la actividad de la UroD de *C. kessleri*.

Tratamiento	Tiempo (días)		Actividad Específica		Inhibición (%)			
	Crecimiento	Tratamiento			vs. Control		vs. MeOH	
			E 1	E 2	E 1	E 2	E 1	E 2
Control	6	0	13,80 ± 0,15	4,44 ± 0,03	0	0	–	–
MeOH +	6	3	4,10 ± 0,20 ^a	1,47 ± 0,15 ^a	70	67	0	0
HCB +	6	3	2,72 ± 0,05 ^{ab}	0,85 ± 0,03 ^{ab}	80	81	34	42
Control	12	0	4,85 ± 0,04	1,08 ± 0,01	0	0	–	–
MeOH +	12	9	6,44 ± 0,69 ^a	1,73 ± 0,23 ^a	-33	-61	0	0
HCB +	12	9	8,96 ± 0,43 ^{ab}	2,25 ± 0,26 ^{ab}	-85	-110	-39	-30

La actividad de la primera etapa (E 1) y de la segunda etapa (E 2) se expresa como la actividad específica media (nmol porfirinas/mg proteínas/h) ± DS. La misma fue determinada en sobrenadantes de homogenato provenientes de cultivos cosechados el día correspondiente a los tres (3) y nueve (9) días de exposición de los cultivos tratados. Se presentan los porcentajes de inhibición relativos a la actividad específica de los cultivos controles (columnas 6 y 7) y, además, para el caso de los cultivos tratados con HCB, los porcentajes relativos a los cultivos tratados con MeOH (columnas 8 y 9). Los valores negativos representan % de activación. Diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto de: ^acontrol; ^bcultivo con metanol solo.

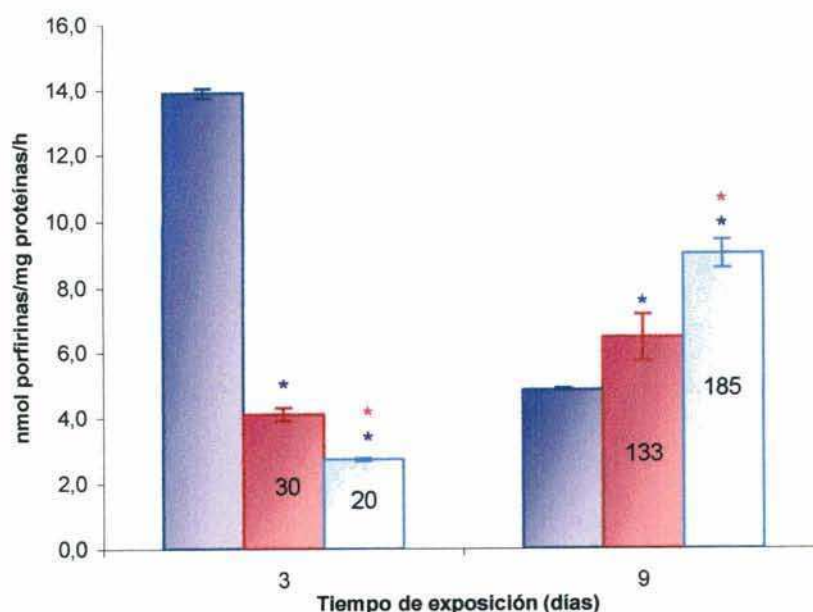


Figura 2. Actividad de la primera etapa de la UroD de cultivos controles (■) y de cultivos tratados con metanol (■) y con HCB (□). Los ensayos fueron realizados como se describe en Materiales y Métodos (con una relación sustrato/proteínas = 20 nmol Urogen III/mg proteínas). La actividad específica de la primera etapa se expresa como la media \pm DS. Los números dentro de las barras indican el porcentaje de actividad con respecto a su respectivo control. Diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto de: *control; *cultivo con metanol solo.

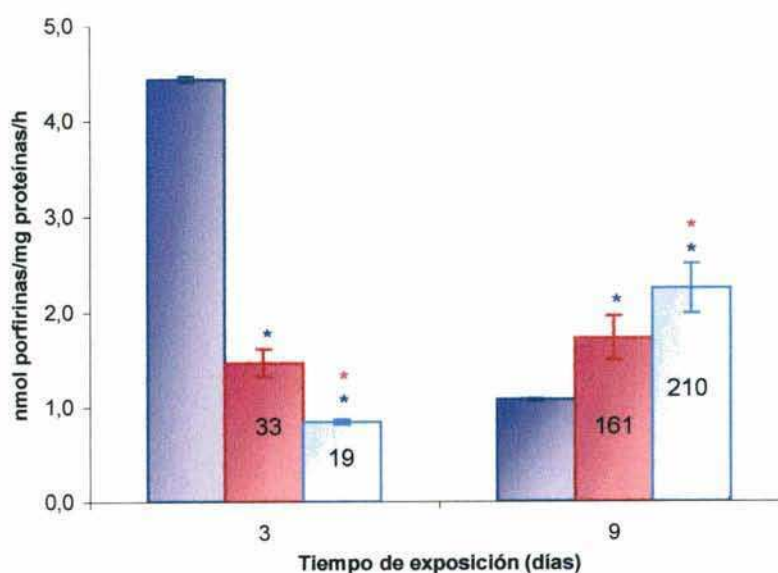


Figura 3. Actividad de la segunda etapa de la UroD de cultivos controles (■) y de cultivos tratados con metanol (■) y con HCB (□). La actividad específica de la segunda etapa se expresa como la media \pm DS. Los números dentro de las barras indican el porcentaje de actividad con respecto a su respectivo control. Diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto de: *control; *cultivo con metanol solo.

III. B. 4. DISCUSION

En esta sección del capítulo III, se estudió el efecto *in vivo* del HCB. Los resultados obtenidos, al analizar el crecimiento, el contenido de clorofila *a* y la actividad de la enzima UroD de la cepa BAFC CA10 de *Chlorella kessleri*, mostraron que este HAP ejerce un efecto tóxico sobre los cultivos, afectando principalmente el crecimiento y la actividad de la UroD.

La exposición de los cultivos de la cepa BAFC CA10 de *Chlorella kessleri* al HCB y al metanol, en las condiciones ensayadas, no tuvo efectos significativos sobre el contenido de clorofila *a* y carotenos, pero sí sobre la tasa de crecimiento (Tabla 1). Como se comentara en la Introducción, numerosos estudios han demostrado que distintos compuestos orgánicos (herbicidas, HAPs incluyendo el HCB, hidrocarburos del petróleo, aceites, etc.) son extremadamente tóxicos para las algas, participando en su toxicidad procesos peroxidativos desencadenados por la generación de especies reactivas de oxígeno. Una propiedad adicional del HCB, es su capacidad de intercalarse entre las cadenas de ácidos grasos de los lípidos de las membranas (Kószó *et al.* 1982), llevando a aumentar la fluidez de las mismas (Billi de Catabbi *et al.* 1997). El desbalance en la permeabilidad, inducido por el HCB *per se* y por peroxidación de lípidos y proteínas enzimáticas y transportadoras, puede llevar a disturbios en los mecanismos de transporte y a un desbalance iónico que provocan una disminución de los procesos metabólicos esenciales, alterándose la síntesis de proteínas y otros compuestos, la actividad de distintas enzimas, la captación de nutrientes, la regulación osmótica y la liberación de autosporas (El Sheekh *et al.* 1994; Tukaj y Bohdanowicz 1995a; Kong *et al.* 1998). Ello podría explicar la disminución del crecimiento y el aumento del volumen celular registrado en algunas especies algales. Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, son acordes con estos antecedentes, ya que pudo observarse una alteración del crecimiento de los cultivos de *C. kessleri* expuestos al HCB (Figura 1). Los cultivos controles siguieron una curva de crecimiento típica de los cultivos en lote, alcanzando su fase estacionaria un poco antes que los cultivos desarrollados en el capítulo II (ítem II.3.1), probablemente debido al alto inóculo inicial aquí empleado ($1,5 \times 10^6$ células /ml vs. $0,013 \times 10^6$ células/ml). Los cultivos expuestos únicamente al metanol, mostraron una disminución de la tasa de crecimiento frente al agregado del contaminante, la cual se mantuvo constante y disminuida hasta el final del bioensayo. En cambio, los cultivos tratados con metanol y HCB mostraron una fuerte caída de la tasa de

crecimiento frente al agregado del contaminante, la cual resultó negativa durante los tres días posteriores a su adición. Sin embargo, durante los seis días subsiguientes se observó una recuperación, con aumento de la tasa de crecimiento a valores superiores a la de los controles, llegando al finalizar el bioensayo a un número de células/ml similar al de estos últimos. Cuando se ensaya la toxicidad de distintos xenobióticos sobre los organismos, frecuentemente se requiere el uso de solventes orgánicos (como acetona, etanol o metanol) para formular las soluciones de los mismo, ya que estos tienen baja solubilidad en agua. Estos solventes pueden influir sobre los resultados del ensayo, porque pueden actuar aditivamente o antagonicamente (El Jay 1996). A pesar de que Muñoz *et al.* (1996) indicaron que el agregado de metanol 0,1% no afecta el crecimiento de *Chlorella vulgaris*, en *C. kessleri* provocó una caída en la tasa de crecimiento que se mantuvo disminuida con respecto al control hasta finalizar el bioensayo. De todas maneras, los cultivos expuestos a la acción conjunta de metanol y HCB mostraron una mayor caída en su tasa de crecimiento. Este efecto aditivo evidenciaría que el HCB tiene un efecto sobre el crecimiento de esta cepa, indicando la toxicidad inherente al mismo. Luego de la caída del crecimiento frente al agregado del tóxico, se observó una recuperación de los cultivos de *C. kessleri* expuestos al HCB. Esta recuperación también ha sido informada en otras algas expuestas a distintos contaminantes como hidrocarburos del petróleo (Tukaj 1989; Tukaj y Bohdanowicz 1995b) y HAPs (Semple *et al.* 1999) y, específicamente, para *C. vulgaris* expuesta a la misma concentración de HCB aquí ensayada (Muñoz *et al.* 1996). Como se comentara en la introducción, las algas acumularían el HCB rápidamente (Muñoz *et al.* 1996) y luego habría una eliminación del mismo en dos etapas, una rápida y otra más lenta (Koelmans *et al.* 1993; Muñoz *et al.* 1996), donde estarían implicados distintos mecanismos de detoxificación que pueden incluir la inducción de respuestas antioxidantes para contrarrestar los efectos de las especies reactivas de oxígeno generadas por el HCB y la metabolización del contaminante. El comportamiento observado en el crecimiento de los cultivos de *C. kessleri* expuestos al HCB, daría indicios de que esta cepa probablemente contaría con un mecanismo de detoxificación, en el cual pueden estar implicados mecanismos de ese tipo. También indicaría, como fue informado por Muñoz *et al.* (1996) para *C. vulgaris*, que seis días serían suficientes para la eliminación del contaminante mediante los mecanismos de detoxificación del alga, permitiendo que recupere su crecimiento. En relación con esto, también existe la posibilidad de que, como ha sido informado para *Scenedesmus obliquus* creciendo en presencia de naftaleno, los compuestos intermediarios producidos durante el catabolismo del HCB sean

utilizados como nutrientes, lo que permitiría aumentar la producción de biomasa y explicaría, en parte, el alcance de un número de células/ml levemente superior al del control. Sin embargo, la determinación fehaciente de la capacidad de respuesta antioxidante y de metabolización de este compuesto por parte de *C. kessleri*, requerirá estudios posteriores para esclarecer los posibles mecanismos implicados. En relación con la respuesta antioxidante, en forma preliminar puede decirse que, dado que no se observaron diferencias significativas en el contenido de carotenos de los cultivos controles y de los cultivos tratados, es probable que su participación no sea importante en el mecanismo de respuesta ante la generación de radicales libres desencadenada por el HCB. Se han iniciado estudios sobre otros marcadores de respuesta antioxidante, como la determinación de los niveles de GSH y de los niveles de actividad de distintas enzimas antioxidantes (catalasa, superóxido dismutasa, glutathion peroxidasa). Con relación a la capacidad de metabolización del HCB, surge la posibilidad de iniciar una nueva línea que lleve al esclarecimiento de los mecanismos implicados, mediante la determinación de productos catabólicos del HCB y la determinación de actividades enzimáticas (citocromo P₄₅₀, dioxigenasa y glutathion-S-transferasa).

Por otra parte, el efecto del HCB sobre el crecimiento de *C. kessleri* fue menor que el observado por Muñoz *et al.* (1996) para *C. vulgaris*, donde la caída inicial alcanzó un 95%. En los ensayos realizados en este trabajo de tesis, el HCB fue agregado cuando el cultivo presentaba una biomasa celular un orden de magnitud mayor que la de los cultivos de *C. vulgaris*, lo que puede haber provocado un efecto de dilución del contaminante asociado a la mayor biomasa algal. De todas maneras, como ocurre con todo tipo de contaminante, las algas también presentan diferencias en la susceptibilidad a los HAPs. Por lo que no puede descartarse la existencia de mecanismos de tolerancia y detoxificación más eficientes en *C. kessleri*, ya que estos pueden ser distintos entre diferentes microalgas e incluso entre distintas cepas de una misma especie (Kasai y Hatakeyama 1993; Tukaj y Bohdanowicz 1995a y b). Además, se debe tener en cuenta la presencia de glucosa en los medios de cultivo de *C. kessleri*. Se ha informado que la conjugación con glucosa es la principal forma de metabolización de algunos HAPs, tales como pentaclorofenol (primer producto de la metabolización del HCB) y 2,4-DCP en plantas superiores (Yang *et al.* 2002). Incluso, se ha demostrado que la glucosa aumenta la degradación de pentaclorofenol en tres especies de *Chlorella* (Tikoo *et al.* 1997) y que, en *Selenastrum capricornutum*, la degradación del HAP

benzopireno se lleva a cabo a través del sistema dioxigenasa, convirtiéndolo finalmente en α y β -glucósidos conjugados (Warshawsky *et al.* 1995; Semple *et al.* 1999). Por lo que no puede descartarse que, en las condiciones de los ensayos realizados aquí, la disponibilidad de glucosa haya favorecido la capacidad de metabolización del HCB por parte de *C. kessleri*.

En cuanto a los estudios realizados sobre la enzima UroD, también se observó un efecto inhibitorio de los contaminantes sobre su actividad (Figuras 2 y 3). Si bien no se observaron mayores diferencias en el contenido de clorofila *a* entre los cultivos tratados y los cultivos controles, sí se observó una alteración de la actividad de la quinta enzima del camino de síntesis de este compuesto (UroD). Es probable que el *pool* previo de clorofila en el momento del agregado del contaminante, dado el muy elevado número de células presentes, fuera lo suficientemente alto como para que la reducción de la actividad de síntesis no incidiera significativamente en el contenido de clorofila final. Luego de tres días de tratamiento con metanol o con metanol más HCB, se produjo una inhibición de la actividad UroD en los cultivos tratados. Nuevamente, se observó un efecto del solvente, *per se*, ya que luego de tres días de exposición al metanol, la actividad de la UroD fue inhibida en aproximadamente un 70% para ambas etapas. Pero, como se especificara para el caso del crecimiento, aquí también se observó un efecto aditivo, ya que los cultivos expuestos durante tres días al HCB presentaron una inhibición adicional (34% para primera etapa y 42% para segunda etapa, con respecto al cultivo expuesto a metanol), llegando a alrededor del 80% para ambas etapas, con respecto a los cultivos controles. Este efecto aditivo, nuevamente estaría indicando una respuesta inherente a la toxicidad del HCB.

Como se aclarara en la Sección A (Efecto del cobre), a excepción de la caracterización de la UroD de *Euglena gracilis* (Juknat *et al.* 1989), no existen trabajos previos sobre la UroD de otras algas, ni existen datos de la influencia del HCB sobre la actividad de esta enzima proveniente de fuentes algales. Sin embargo, distintos autores han demostrado, *in vivo*, que el HCB disminuye la actividad de la UroD de otros organismos (Billi de Catabbi *et al.* 1997; Chaufan *et al.* 2001). Este efecto se ha asociado tanto a los productos intermedios producidos durante la metabolización del HCB, que pueden producir cambios conformacionales en la enzima o interferir directamente con los residuos de histidina y grupos sulfhidrilos de su sitio activo (Botham 1990; Davies 1990; Billi de Catabbi y San Martín de Viale 1994; Bagchi *et al.*

1995), como a la generación de especies reactivas de oxígeno inducida por este compuesto (Bagchi *et al.* 1995; Billi de Catabbi *et al.* 1997). Además de los procesos de peroxidación desencadenados por estas últimas, que involucran la oxidación de proteínas y determinan la inhibición enzimática, se ha sugerido que el rol inhibitorio de las especies reactivas de oxígeno, generadas por la presencia de HCB, podría deberse a la formación de un inhibidor de la UroD. En este sentido, tanto Ríos de Molina *et al.* (1980) como Cantoni *et al.* (1984) y Smith y Francis (1987), reportaron la presencia de un inhibidor en hígado de ratas tratadas con HCB y en ratones tratados con otros HAPs. Este inhibidor se originaría por la oxidación del anillo porfirínico del Urogen (primer sustrato de la UroD) (Francis y Smith 1988). La inhibición de la actividad UroD ejercida por este compuesto llevaría a la acumulación de más Urogen, el cual podría actuar como atrapante de radicales libres y no aumentaría la producción de especies reactivas de oxígeno (Billi de Catabbi *et al.* 1997). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que en el sistema de *C. kessleri*, debido a las condiciones de exposición a la luz, sí podría existir una exacerbación de los efectos del HCB, recordando lo que ocurre en el caso de la enfermedad porfiria cutánea tarda, donde se presenta un fenotipo asociado a procesos de fotooxidación de porfirinas. Entonces, en los cultivos de *C. kessleri*, ante la presencia de especies reactivas de oxígeno, el Urogen se oxidaría a Uro, la cual, por no ser sustrato enzimático, se acumularía y a su vez generaría más especies reactivas de oxígeno en presencia de luz (Mock *et al.* 1998), favoreciendo la formación de más inhibidor. Todos estos procesos, llevan a una disminución de la actividad UroD y se ha demostrado que el HCB inhibe tanto la primera como la segunda etapa catalizada por esta enzima, afectando todos los pasos de decarboxilación al mismo grado (Ríos de Molina *et al.* 1987; Vilas *et al.* 1999). Ríos de Molina *et al.* (1987) reportaron una inhibición del 76% para la primera etapa y del 94% para la segunda etapa, en ratas tratadas con HCB. Pero, midiendo ambas etapas a saturación de sus respectivos sustratos, el porcentaje de inhibición fue el mismo para las dos (aproximadamente 84%; Ríos de Molina *et al. op. cit.*). En el caso de *C. kessleri* (Figuras 2 y 3), se observó una inhibición de alrededor del 80% con respecto al control para ambas etapas, mientras que si se compara con respecto al cultivo tratado únicamente con metanol se observa una inhibición más alta para la segunda etapa. Esto puede deberse a que, al igual que lo reportado en ratas, además de la inhibición ejercida por el HCB sobre esta etapa, existe menor disponibilidad de su sustrato por la inhibición ejercida sobre la primera.

Cuando los cultivos son expuestos a los contaminantes durante más tiempo (nueve días), como se observó al analizar el crecimiento, también se pone de manifiesto que existe una notable recuperación en la actividad UroD. Ello puede relacionarse a la eliminación o detoxificación del xenobiótico por el alga, lo cual determinaría que se recuperen los niveles normales de biosíntesis y/o actividad. Sin embargo, se observa que existe una inducción de la actividad, tanto por metanol como por metanol más HCB, ya que la actividad de los cultivos expuestos durante nueve días supera la actividad de los cultivos expuestos durante tres días e, incluso, supera la actividad de los controles correspondientes a los nueve días de exposición (Figuras 2 y 3). Es probable que el camino de detoxificación, así como puede llevar a la síntesis de un inhibidor durante los primeros tres días, luego puede metabolizar el HCB a un compuesto que actúe como activador (mecanismo aún no comprobado). En este análisis, también se debe tener en cuenta la presencia de glucosa en los medios de cultivo. Además de favorecer la metabolización del HCB, como se explicó más arriba, por su disponibilidad para la formación de conjugados, lo cual permitiría la disminución de especies reactivas de oxígeno, la glucosa inhibe la actividad de la primera enzima del camino biosintético de la clorofila (ALAS) (Cánepa *et al.* 1984). De esa manera contrarresta la activación que sufre esta enzima, cuando disminuye la actividad UroD, debida a la disminución de la concentración del producto final del camino (hemo), que es el que ejerce una regulación por retroinhibición sobre la actividad ALAS. Ese efecto de la glucosa, lleva a disminuir la acumulación de Uro y por ende la producción de especies reactivas de oxígeno y la producción del inhibidor de la UroD (por haber menos Uro y menos especies reactivas de oxígeno). Todos estos procesos podrían determinar una reactivación del camino y llevar a una recuperación e incluso a una inducción de la actividad de sus enzimas, como se observa específicamente para la UroD (actividad 85% y 110% superior a la del control, para la primera y segunda etapa respectivamente). Esa inducción de la actividad UroD, observada en los cultivos expuestos al HCB, permite pensar en la posibilidad de que, luego de la detoxificación, se exacerben distintos procesos metabólicos que lleven al aumento de la tasa de crecimiento. Asimismo, cabe la posibilidad de que durante la respuesta antioxidante se activen genes de enzimas que favorezcan el crecimiento algal (Sen *et al.* 2000).

Si bien, luego de nueve días de exposición a HCB y metanol, aparentemente existe una activación de la UroD (Figuras 2 y 3), su actividad no se recupera a los valores de los cultivos controles correspondientes a los tres días de exposición (seis días de crecimiento, última etapa

de la fase exponencial). Como se determinara en el capítulo II, la actividad UroD depende de la fase de crecimiento, y es máxima durante la fase exponencial, cayendo hacia la fase estacionaria. En ese sentido, la caída de la actividad de esta enzima (65% y 76% para primera y segunda etapa, respectivamente), observada en los cultivos controles cosechados luego de doce días de crecimiento (fase estacionaria) con respecto a la de los controles que crecieron durante seis días (última etapa de la fase exponencial) concuerda con la disminución del 77% entre fase exponencial tardía y estacionaria, registrada en el capítulo anterior (ítem II.3.3.3).

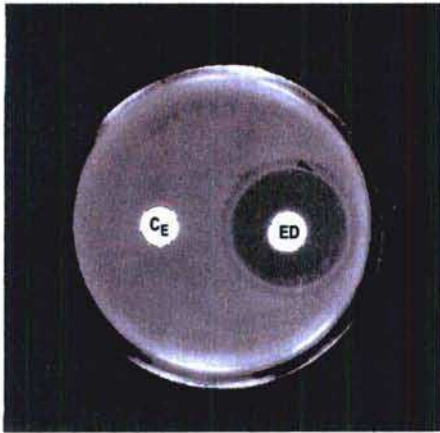
Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis muestran que el HCB tiene efectos dañinos a nivel del metabolismo celular de *C. kessleri* a corto plazo, pero que pueden ser contrarrestados a mediano o largo plazo. El efecto inhibitorio, ejercido por la exposición al HCB durante tres días, sobre la actividad de una enzima clave del camino biosintético de la clorofila, daría indicios de que, entre los mecanismos de acción del contaminante, se encuentran involucrados daños a nivel enzimático. Ello podría explicar, en parte, la disminución del crecimiento observada en los cultivos. Se comprobó también, que la UroD de *C. kessleri*, al igual que en otros organismos, es un blanco de acción del HCB. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la determinación de la actividad UroD en *C. kessleri* podría constituir una herramienta, adicional al análisis del crecimiento, para evaluar el impacto de contaminación reciente con HAPs en ecosistemas acuáticos.

III. B. 5. CONCLUSIONES

En esta sección se presentaron los resultados obtenidos al estudiar el efecto del HCB sobre los cultivos de la cepa BAFC CA10 de *C. kessleri*. Dichos resultados demuestran la factibilidad del uso de *C. kessleri* en estudios de contaminación y, en base a ellos, puede concluirse que:

- ❖ El HCB tiene efectos dañinos a nivel del metabolismo celular de esta cepa de *C. kessleri* a corto plazo, pero que pueden ser contrarrestados a mediano o largo plazo. Estando implicados daños a nivel enzimático.
- ❖ La concentración de HCB, ensayada en este estudio, tiene un efecto inhibitorio sobre la tasa de crecimiento y sobre la actividad de la enzima UroD de *C. kessleri*.
- ❖ Es probable que esta cepa cuente con mecanismos de detoxificación (repuesta antioxidante y metabolización del contaminante) que permitan la eliminación del HCB en corto tiempo, permitiendo la recuperación de su crecimiento y de su actividad UroD. En este sentido, la determinación fehaciente de la capacidad de respuesta antioxidante y de metabolización del HCB por parte de *C. kessleri* requerirá estudios posteriores.
- ❖ En principio, los carotenos no ejercerían un aporte importante en la respuesta ante la generación de radicales libres desencadenada por el HCB. Los resultados indican la necesidad de continuar con estudios sobre otros marcadores de respuesta antioxidante (nivel de glutatión y ascorbato, nivel de actividad de catalasa, superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa, glutatión peroxidasa) y con estudios sobre la capacidad de metabolización del HCB (determinación de productos catabólicos del HCB, determinación de actividad citocromo P₄₅₀, dioxigenasa y glutatión-S-transferasa) para clarificar los mecanismos involucrados.
- ❖ La determinación de la actividad UroD puede constituir una herramienta, adicional al estudio del crecimiento, para evaluar la contaminación reciente con HAPs, sobre los ecosistemas acuáticos.

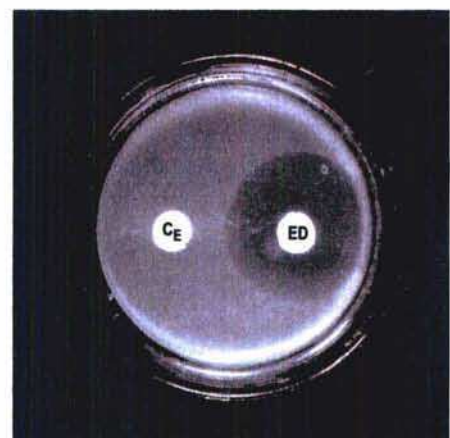
- ❖ Estudios del efecto de la contaminación a largo plazo, requerirán la aplicación de otras estrategias, como el seguimiento de los cultivos bajo un agregado periódico del tóxico al medio.



III. SECCIÓN C

PRODUCCIÓN DE SUSTANCIAS

ANTIMICROBIANAS



III. C. 1. INTRODUCCIÓN

Un aspecto interesante de las microalgas en general y del género *Chlorella* en particular, es el potencial valor biotecnológico, que día a día se pone más de manifiesto. Las algas son un grupo de organismos muy diverso que ocupan una amplia variedad de nichos ecológicos. Como tales, tienen la potencialidad de ser una fuente rica de compuestos naturales “útiles” para el hombre, incluyendo compuestos bioactivos. El aumento de la demanda en el mercado de compuestos químicos de alto valor agregado y de suplementos nutricionales de origen algal, ha llevado al desarrollo y explotación comercial de los cultivos de microalgas. Las microalgas han sido investigadas como fuente de pigmentos, polisacáridos, lípidos, aceites e hidrocarburos (Borowitzka y Borowitzka 1988; Metting 1996). También han sido usadas para la producción de compuestos bioquímicos aplicados en investigación, como ficobilinas (utilizadas como marcadores fluorescentes celulares), compuestos isotópicamente marcados estables (glucosa, glicerol, ácidos grasos, proteínas y otras moléculas) y lubricantes deuterados (Metting 1996; Apt y Behrens 1999). El foco principal de la biotecnología de microalgas en los últimos años ha sido el desarrollo de suplementos nutricionales para animales y humanos y su explotación comercial se encuentra dominada por la producción de biomasa seca o de extractos celulares de *Chlorella* (Lee 1997; Yamaguchi 1997), *Dunaliella* (Avron y Ben-Amotz 1992) y *Spirulina* (Vonshak 1997). Muchas microalgas sintetizan pigmentos, vitaminas y sus precursores, tales como β -caroteno (provitamina A), ácido L-ascórbico (vitamina C), vitamina B₁₂, B₆, biotina, α , β y γ -tocoferol (Brown y Farmer 1994; Metting 1996) que se utilizan en formulaciones cosméticas y en acuicultura. Como la pigmentación es un factor importantísimo para la aceptación comercial de peces y crustáceos, por ejemplo, el carotenoide astaxantina, producido por cultivos de *Hematococcus*, se utiliza en acuicultura para suplementar la alimentación de los mismos y mejorar su pigmentación (Shahidi *et al.* 1998). *Dunaliella salina* es la mejor fuente natural de β -caroteno y se cultiva comercialmente para usarlo como suplemento dietario y colorante alimentario natural (Borowitzka 1995). *Spirulina* es una excelente fuente de ficocianina y se usa como colorante de alimentos y de productos cosméticos (Borowitzka y Borowitzka 1988; Metting 1996). Las microalgas, especialmente las marinas, también son una excelente fuente de ácidos grasos poliinsaturados (Yamaguchi 1997), siendo los más importantes los omega-3 de cadena larga (LC-PUFAs), que son importantes en nutrición humana y son esenciales para el tratamiento y

prevención de diferentes enfermedades (Cohen *et al.* 1995; Behrens y Kyle 1996).

Es así que existen numerosas compañías que producen y comercializan microalgas y sus derivados, principalmente en países asiáticos de la franja del Pacífico (Lee 1997). Allí hay alrededor de 90 plantas de producción de microalgas, con rendimientos de entre 3 y 500 toneladas anuales. Por ejemplo: en Israel, la Beta Technologies Ltd. (NBT) produce 1,5 toneladas anuales de β -caroteno y 25 toneladas anuales de *Dunaliella bardawii*; Japón es un gran productor de *Chlorella* (Heian Chlorella GFC Co. Ltd., actualmente Sun Chlorella, comenzó a operar en 1969) y además importa *Spirulina* de USA y β -caroteno, EPA y DHA de Israel; en Corea se producen, principalmente, algas vivas para acuicultura; en Indonesia, la compañía Sun Chlorella Indonesia produce 150 toneladas anuales de polvo de *Chlorella*; en Taiwan, existen 6 compañías productoras de *Chlorella* y 5 de *Spirulina*. Además, en otras zonas del mundo, también se encuentran operando compañías productoras de microalgas, principalmente de *Spirulina* (en USA, Chile y Cuba), *Haematococcus* (en USA) y *Dunaliella* (en Australia). En todos estos procesos de producción, es sumamente importante controlar el desarrollo de la especie, por lo que es indispensable conocer el metabolismo algal y establecer las condiciones óptimas de cultivo.

Si bien la explotación comercial de los cultivos de microalgas con fines nutricionales y de producción de compuestos de alto valor agregado se encuentra bastante avanzada, no ocurre lo mismo con la producción de compuestos con actividad biológica. De alguna manera, las algas comparten características metabólicas con las plantas superiores y con los microorganismos. Ambos grupos han probado ser fuentes ricas de compuestos bioactivos; entonces, en principio, es razonable esperar que las algas también puedan servir como una importante fuente de este tipo de compuestos. La mayoría de los trabajos en el pasado, se han focalizado en las macroalgas marinas y las microalgas recién comenzaron a estudiarse ampliamente en la década del 80 (Moore *et al.* 1988; Kelam y Walker 1989; Patterson *et al.* 1991). Las microalgas de agua dulce, no sólo son una fuente valiosa de nuevas moléculas biológicamente activas, sino que resultan más fáciles de cultivar que las macroalgas marinas y, en algunos casos, pueden rendir grandes biomásas. Ello representa una ventaja importante para la investigación y producción comercial de sustancias farmacológicamente activas. Se ha demostrado que un gran número de extractos celulares y extracelulares de microalgas tienen actividad antibacteriana, antifúngica, antialgal y antiprotozo (Apt y Behrens 1999). Aunque

para muchos de ellos aún no se conoce la estructura e identidad del constituyente activo (Borowitzka 1995; Apt y Behrens 1999), puede decirse que las algas poseen un potencial importante en esta área, ya que producen compuestos biológicamente activos que podrían desarrollarse comercialmente. En las últimas décadas, diferentes autores han abordado el estudio de sustancias inductoras y/o inhibidoras del crecimiento en cultivos algales. Se ha establecido que ellas producen una gran variedad de metabolitos secundarios, muchos de los cuales poseen actividades biológicas específicas, como actividad algostática y alguicida (Cannell 1993), actividad antibacteriana (Accorinti y Rodríguez 1988; de Caire *et al.* 1993; Apt y Behrens 1999; Romero López y Pérez Hernández 1999), actividad antifúngica (Accorinti 1987a; de Mulé *et al.* 1996; Apt y Behrens 1999; Zulpa *et al.* 2003), actividad antiviral (incluyendo anti HIV) (Accorinti *et al.* 1983; Hayashi *et al.* 1996; Fabregas *et al.* 1999), actividad antineoplásica o antitumoral (Noda *et al.* 1998; Tanaka *et al.* 1998), actividad neurológica (Laguna *et al.* 1993; Cannell 1993; Berman *et al.* 1999) y actividad sobre el sistema inmune (Noda *et al.* 1998; Dantas *et al.* 1999; Hasegawa *et al.* 1999). Otras funciones biológicas reportadas para las algas y para extractos algales incluyen inhibición enzimática, hemólisis, actividad anticoagulante, actividad antihipertensiva, actividad antiinflamatoria, actividad anticonvulsiva, inhibición de polimerización de microtúbulos y actividad insecticida (Cannell 1993; Paul *et al.* 1995; Okai y Higashi-Okai 1997).

Las microalgas verdes de agua dulce (Chlorophyta), y especialmente el género *Chlorella*, también han sido objeto de numerosos estudios sobre la producción de compuestos bioactivos (Accorinti y Rodríguez 1988; Burkiewicz y Synak 1996; Juárez y Accorinti 1995). Esos estudios incluyen tanto la búsqueda de metabolitos celulares como extracelulares, comprobándose que ciertas especies, como *Chlorella vulgaris* y *Chlorella pyrenoidosa* liberan al medio sustancias que poseen propiedades antibacterianas y/o antifúngicas frente a una variedad de organismos patógenos. Desde el aislamiento de la “clorelina” extracelular, a partir de sobrenadantes de cultivos de *Chlorella vulgaris* (Pratt 1944), numerosos autores han realizado evaluaciones *in vitro* de la producción de principios bioactivos, endo y extracelulares, en diversas especies de Chlorophyta y específicamente en el género *Chlorella* (Tabla 1).

Tabla 1. Actividad biológica informada para distintas especies del género *Chlorella*.

Especie	Fracción	Actividad	Organismos ensayados	Referencia
<i>C. autotrophica</i>	celular	antiviral		Fabregas <i>et al.</i> 1999.
<i>C. emersonii</i>	celular	antibacteriana	<i>Bacillus subtilis</i>	Cannell <i>et al.</i> 1988.
<i>C. kessleri</i>	extracelular	antibacteriana antifúngica	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Candida albicans</i>	Juárez y Accorinti 1995.*
<i>C. pyrenoidosa</i>	celular	antibacteriana	<i>Corynebacterium diptheriae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Proteus vulgaris</i>	Accorinti 1981.
	extracelular	antibacteriana	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Accorinti 1981.
<i>Chlorella</i> sp.	celular	antibacteriana antifúngica	<i>Salmonella intestinalis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Accorinti 1981; Romero López y Pérez Hernández 1999.
<i>C. stigmatophora</i>	celular	neurológica		Laguna <i>et al.</i> 1993.
	extracelular	antibacteriana	<i>Staphylococcus aureus</i>	Accorinti 1981.
<i>C. vulgaris</i>	celular	antibacteriana antifúngica antitumoral inmunoactivador	<i>Escherichia coli</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Tricophyton cutaneum</i>	Matusiak y Krzywicka 1975; Accorinti 1981; Cannell <i>et al.</i> 1988; Noda <i>et al.</i> 1996 y 1998; Hasegawa <i>et al.</i> 1997 y 1999; Tanaka <i>et al.</i> 1997 y 1998; Dantas <i>et al.</i> 1999.
	extracelular	antibacteriana antifago	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Diversos fagos</i>	Accorinti 1981.

*Publicación de parte de los resultados de los estudios realizados para este trabajo de tesis.

También se han encarado investigaciones que permitieron aproximarse al conocimiento de las propiedades físicas, químicas y biológicas de los principios activos. Se ha comprobado que los antibióticos de las algas incluyen: compuestos aromáticos y alifáticos, lípidos insaturados,

lípidos peroxidados, ácidos grasos, glicolípidos, polisacáridos y otros carbohidratos, péptidos, fenoles, bromofenoles, terpenoides, alcaloides y derivados de clorofila (Accorinti 1987b; Meeting 1996; Mayer y Hamann 2002). Se han caracterizado algunos compuestos bioactivos aislados a partir de microalgas de agua dulce, incluyendo Cyanophyta y Chlorophyta: “cyanovirin”, un sulfolípido de *Nostoc ellipsosporum* que inactiva irreversiblemente al HIV sin efectos adversos sobre las células hospedadoras (Gustafson *et al.* 1989; Boyd *et al.* 1997; Apt y Behrens 1999); “cuprochlorophyll”, un derivado de la clorofila de una cepa de *Chlorella* sp. que posee actividad antibacteriana (Romero-López y Pérez-Hernández 1999) y “glycoprotein ARS2”, una glicoproteína de *Chlorella vulgaris* que presenta actividad antitumoral (Noda *et al.* 1996).

A pesar del creciente número de nuevos compuestos bioactivos que han sido identificados en las algas, excepto por el caso del ácido α -kainico (obtenido de la macroalga *Digenea*, Rhodophyta) que se comercializa desde hace años como antihelmíntico (Cannell 1993), hasta el momento no existen ejemplos de metabolitos algales que se produzcan comercialmente en la industria farmacéutica o agroquímica. Como la probabilidad de desarrollo exitoso de un nuevo fármaco está directamente correlacionado con la cantidad de investigaciones que se desarrollen, la falta de productos comerciales de origen algal podría deberse a la cantidad relativamente limitada de investigaciones farmacéuticas llevadas a cabo en estos organismos. Sin embargo, los ejemplos mencionados arriba, demuestran que las algas producen una gran variedad de productos biológicamente activos. Ello destaca la importancia de estudiar la producción de este tipo de compuestos en distintas especies de microalgas, ya que debido a la capacidad de cultivarlas masivamente, representan una interesante fuente de producción de nuevos compuestos químicos útiles.

En el caso particular de este trabajo de tesis, la cepa BAFC CA 10 de *Chlorella kessleri* ha sido aislada de la Laguna Verde (Complejo Termal Copahue, Neuquén Argentina), cuyas aguas son utilizadas con fines terapéuticos, principalmente en el tratamiento de afecciones cutáneas como dermatitis stafilococcicas, psoriasis, candidiasis, etc. (Ubogui *et al.* 1991). Por ese motivo resultó interesante encarar el estudio de las propiedades antibióticas de las aguas de la Laguna Verde y de las sustancias liberadas al medio de cultivo por esta cepa de *Chlorella kessleri*, que corresponde a la especie algal dominante en ese cuerpo de agua (Juárez y Vélez 1993). Por otra parte, los trabajos de investigación de las propiedades

antimicrobianas de microalgas verdes realizados hasta el momento, incluyen principalmente estudios con especies atermas; no registrándose en la bibliografía investigaciones sobre la producción de sustancias antibióticas en clorofitas de áreas termales.

- Sobre la base de todos los antecedentes planteados, se estableció como objetivo, en esta sección de la tesis, estudiar la potencialidad de *Chlorella kessleri* como fuente de compuestos biológicamente activos. Para ello, se evaluó, *in vitro*, la actividad antimicrobiana de extractos extracelulares frente a diversas bacterias y hongos patógenos, para establecer si la acción terapéutica exhibida por el agua de la laguna puede deberse, en parte, a la existencia de sustancias antimicrobianas liberadas por la microalga dominante en ese cuerpo de agua (*C. kessleri*).

III. C. 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se ensayó la actividad antimicrobiana, *in vitro*, de extractos obtenidos a partir del agua de la Laguna Verde y de extractos obtenidos a partir de sobrenadantes de cultivos axénicos de la cepa BAFC CA 10 de *C. kessleri* aislada de dicha laguna, frente a *Candida albicans* y a *Staphylococcus aureus* (microorganismos comúnmente causantes de afecciones cutáneas). Por otra parte, se ensayó la actividad antimicrobiana de extractos obtenidos a partir de sobrenadantes de cultivos de *C. kessleri* en fase estacionaria de crecimiento, frente a diversas bacterias y hongos patógenos.

III. C. 2. 1. Actividad antimicrobiana del agua de la Laguna Verde y de sobrenadantes de cultivos axénicos de *C. kessleri* en fase exponencial y estacionaria de crecimiento

Para estudiar los efectos antibióticos del agua de la Laguna Verde, se tomó, *in situ*, una muestra de 20 l, se filtró a través de una red de fitoplancton de 15 μm de poro seguido por pasaje a través de membrana Millipore de 0,45 μm y se procedió a la preparación de los extractos.

Para estudiar los efectos antibióticos de los productos liberados al medio por *C. kessleri*, se iniciaron dos cultivos axénicos en 1.500 ml de medio BBM adicionado con glucosa 1‰ y se incubaron bajo condiciones estándar. Uno de los cultivos se cosechó a los 4 días, durante su fase de crecimiento exponencial, mientras que el otro se cosechó a los 35 días, durante su fase de crecimiento estacionaria (de acuerdo con la caracterización del crecimiento realizada en el capítulo anterior, ítem II.3.1). Cada cultivo se filtró a través de filtro Millipore de 0,45 μm de poro, se descartó la fracción celular y se procedió a la preparación de los extractos a partir de los sobrenadantes.

La secuencia de extracción de los metabolitos bioactivos, tanto para el agua de la laguna como para los sobrenadantes de los cultivos, se realizó de acuerdo a Stahl (1965) y Veerport (1998) e involucró: 1) adsorción en columna de carbón activado; 2) elución secuencial de la columna con solventes de polaridad decreciente (metanol, acetato de etilo y éter etílico); 3) concentración de los eluidos por evaporación al vacío, previa deshidratación con Na_2SO_4 anhidro para el caso del extracto etéreo.

La actividad antibiótica de los distintos extractos obtenidos fue ensayada frente a *Candida albicans* y frente a *Staphylococcus aureus* mediante antibiogramas de disco, según se describe en el ítem III.C.2.3. Adicionalmente, se probó la estabilidad al almacenamiento del extracto etéreo del agua de la laguna, repitiendo los antibiogramas luego de 7 y 20 días de almacenamiento a 0°C.

III. C. 2. 2. *Actividad antimicrobiana de sobrenadantes de cultivos axénicos de C. kessleri en fase estacionaria de crecimiento*

Una vez analizado el efecto de los extractos antes descritos, se realizó el estudio de la actividad antimicrobiana de extractos etéreos obtenidos a partir de sobrenadantes de cultivos en fase estacionaria de crecimiento (desarrollados de acuerdo al ítem III.C.2.1). Se prepararon tres extractos etéreos: ED, por extracción directa del sobrenadante con éter etílico (sobrenadante/éter 1,5: 1, v/v); EC, concentrando previamente el sobrenadante a 50°C y ER, por adsorción en resina de amberlite XAD₂ (Dressler 1979) seguida de elución con éter etílico (Figura 1).

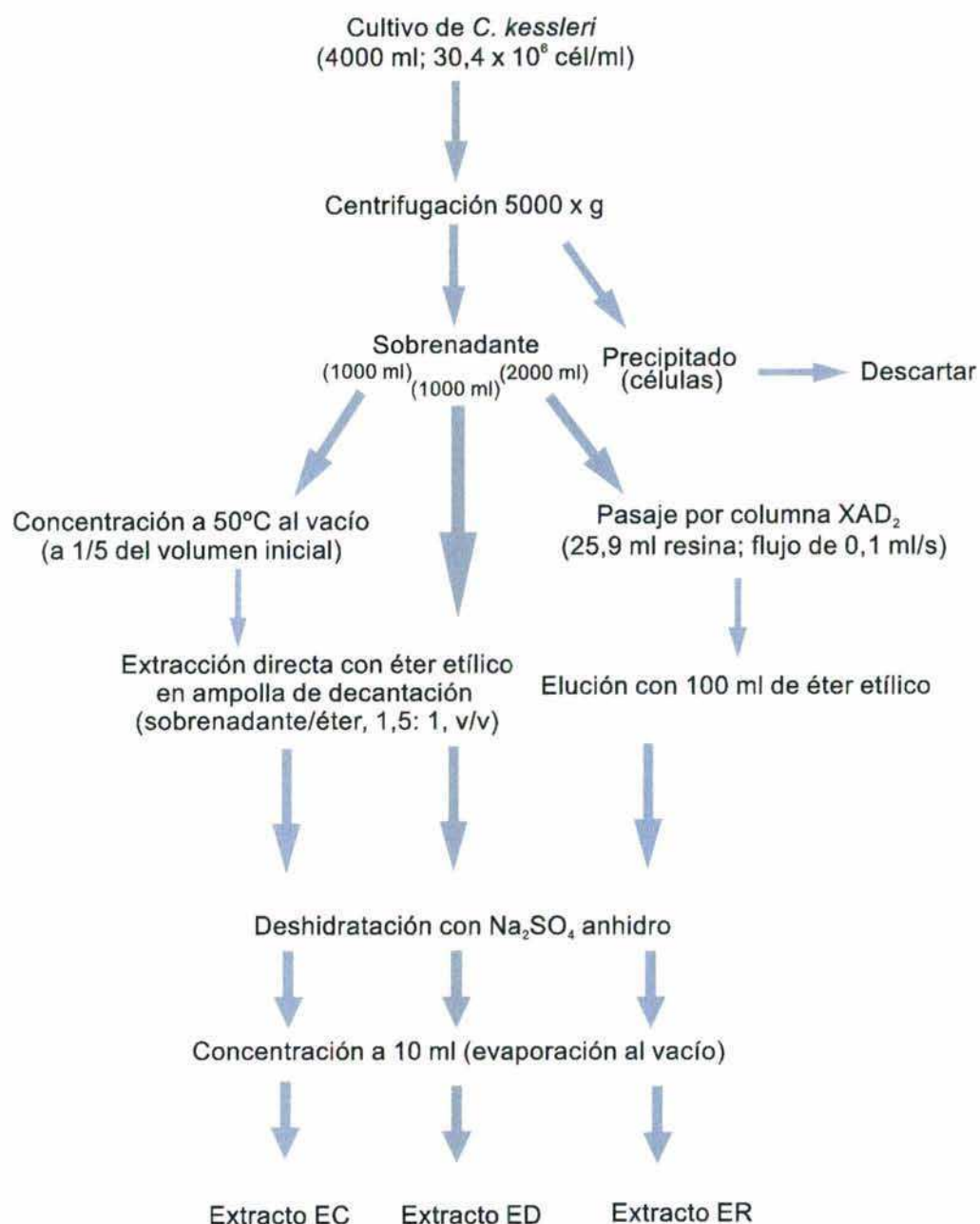


Figura 1. Marcha de extracción del sobrenadante del cultivo de *C. kessleri* en fase estacionaria de crecimiento.

La actividad antibiótica de los distintos extractos obtenidos (EC, ED y ER) fue ensayada frente a 10 cepas de microorganismos patógenos. Adicionalmente, se probó la estabilidad al almacenamiento del extracto ED, repitiendo los antibiogramas, luego de 8 meses de almacenamiento a 0°C, frente a *Staphylococcus aureus* y *Mycobacterium tuberculosis*.

III. C. 2. 3. Ensayos de actividad antimicrobiana

Todas las cepas patógenas utilizadas en este estudio, excepto la de *Candida albicans*, corresponden a aislamientos clínicos del Laboratorio de Tuberculosis del Hospital Muñiz, y fueron gentilmente provistas por la Dra. María Josefina Squadrone y por la Dra. Marta Di Lonardo (Directora del Laboratorio Dr. Chetrángolo y de la Cátedra de Tisioneumunología, Universidad de Buenos Aires y Hospital Muñiz): *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, 333 *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Bacillus anthraxis*, *Actinomyces* sp., *Candida albicans* (cepa ATCC 64385). Para destacar el efecto antibiótico de los extractos, se decidió probarlos frente a 3 especies de micobacterias multirresistentes (Tabla 2): 733 *Mycobacterium tuberculosis*, 1313 *M. fortuitum* y 1178 *M. grupo MAC*.

Tabla 2. Resistencia a las drogas antibacilares de las cepas de micobacterias.

Cepas	Resistencia
<i>M. tuberculosis</i>	A-Cs-E-H-R-S-Z
<i>M. fortuitum</i>	A-Cs-E-H-K-P-R-S
<i>M. grupo MAC</i>	A-Cs-E-H-P-R-S

A: Ansamicina, Cs: Cicloserina, E: Etambutol, H: Isoniacida, K: Kanamicina, P: Ácido para amino salicílico, R: Rifampicina, S: Estreptomicina, Z: Pirazinamida.

Los efectos antibióticos se evaluaron mediante antibiogramas de disco desarrollados por la técnica de difusión en agar (Collins *et al.* 1989). Para ello, se inocularon 600 millones de células/ml de cada una de las cepas dentro de medio ATS (ver Capítulo I) a 50°C. Se dejó gelificar y se procedió a colocar los discos de papel de filtro 3MM impregnados con cada

extracto. En todos los ensayos, se sembraron 50 μ l del extracto y 50 μ l del solvente de extracción correspondiente como control (metanol, acetato de etilo y éter etílico).

Los antibiogramas se incubaron a 37° C y los resultados se leyeron a partir de las 24 hs. de incubación y hasta los 20 días, debido al crecimiento lento de las cepas de *Mycobacterium*. Los ensayos se repitieron 2 veces por duplicado y la actividad antibiótica se refirió como el diámetro de los halos de inhibición.

III. C. 2. 4. *Análisis parcial de la composición de los extractos*

El extracto etéreo obtenido a partir del sobrenadante del cultivo en fase estacionaria (ED, ítem III.C.2.1) fue analizado por cromatografía preparativa ascendente en papel y cromatografía ascendente en placa delgada (TLC).

Las cromatografías preparativas fueron desarrolladas en papel Whatman 3MM a temperatura ambiente, sembrando 300 μ l del extracto en la línea de partida y usando éter de petróleo: metanol: ácido fórmico (50: 5: 45, v/v) como solvente de desarrollo (Smith 1963). En todos los casos, se realizaron biocromatogramas (Accorinti 1980): para ello, se corrieron cromatogramas paralelos y luego de su desarrollo se cortaron las secciones de papel cromatográfico correspondientes a cada R_f (detectados con los distintos reveladores en la corrida paralela) y se aplicaron en antibiogramas contra *C. albicans* y *S. aureus*. Las detecciones químicas de sustancias hidrosolubles y liposolubles se hicieron de acuerdo a Smith (1963) y Kates (1988), usando los siguientes reveladores: verde de bromocresol, azul de bromofenol, ácido tricloroacético, ácido fosfomolibdico, rodamina B, vapores de yodo, ninhidrina, reactivo de Schiff, cloruro férrico, nitrato de plata.

Las corridas en TLC fueron desarrolladas en placas de sílica gel Merck 60 F₂₅₄ de 0,2 mm de espesor con base de aluminio, sembrando 300 μ l del extracto y usando tolueno: ácido acético (200: 30, v/v) como solvente de desarrollo (White y James 1985). Las detecciones químicas de lípidos y terpenoides se realizaron revelando las placas con rodamina B y ácido sulfúrico concentrado seguido de calentamiento en estufa a 90°C, respectivamente (Stahl y Jork 1965; White y James 1985; Kates 1988). En este caso, también se realizaron biocromatogramas (Accorinti 1980), para lo cual se corrieron placas paralelas y luego de su desarrollo se rasparon las secciones de sílica correspondientes a cada R_f (detectados con los distintos reveladores en

la corrida paralela), que se eluyeron con éter etílico y se aplicaron en antibiogramas contra *C. albicans* y *S. aureus*.

En los extractos etéreos ED, ER y EC, se determinó el contenido de hidratos de carbono totales (Dubois *et al.* 1956), proteínas totales (Bradford 1976) y compuestos lipídicos por estimación de dienos conjugados y malondialdehído (MDA) (Figuras 2 y 3). Los dienos conjugados se determinaron por una modificación del método propuesto por Kates (1988). El MDA se determinó mediante la reacción con ácido tiobarbitúrico (modificado a partir de Ohkawa *et al.* 1979). Además, se llevó a cabo la extracción clorofórmica de pigmentos tetrapirrólicos, previa esterificación en metanol: sulfúrico (19:1) y posterior identificación por HPLC (según se describe en los ítems II.2.3.1 y II.2.3.2 del capítulo II). Adicionalmente, se evaluó la actividad antibiótica de esa fracción conteniendo pigmentos tetrapirrólicos, realizando antibiogramas frente a *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Candida albicans*.

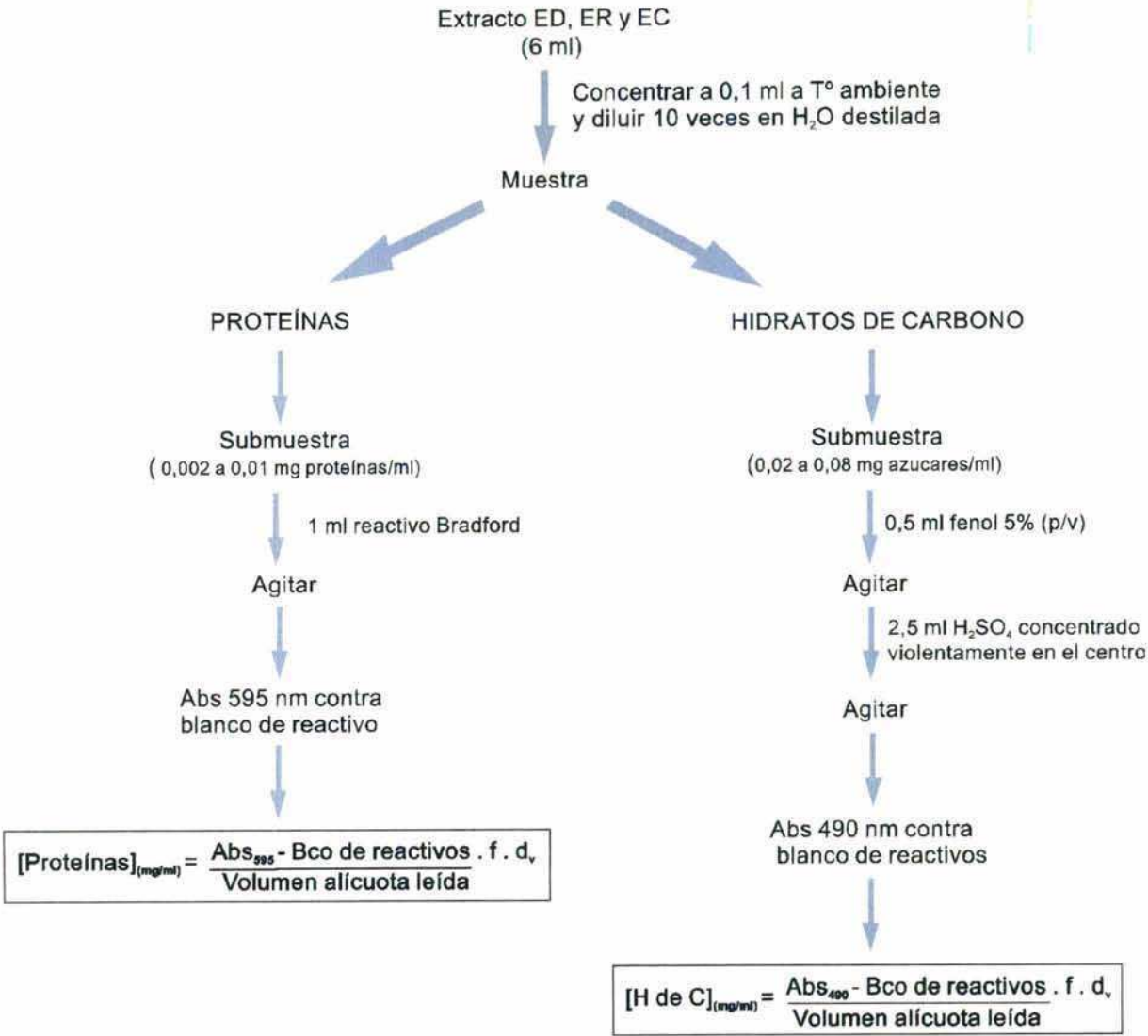


Figura 2. Protocolo para la determinación de proteínas e hidratos de carbono (H de C) en los extractos ED, ER y EC. dv: volumen final/volumen inicial; f: 1/pendiente curva de calibración.

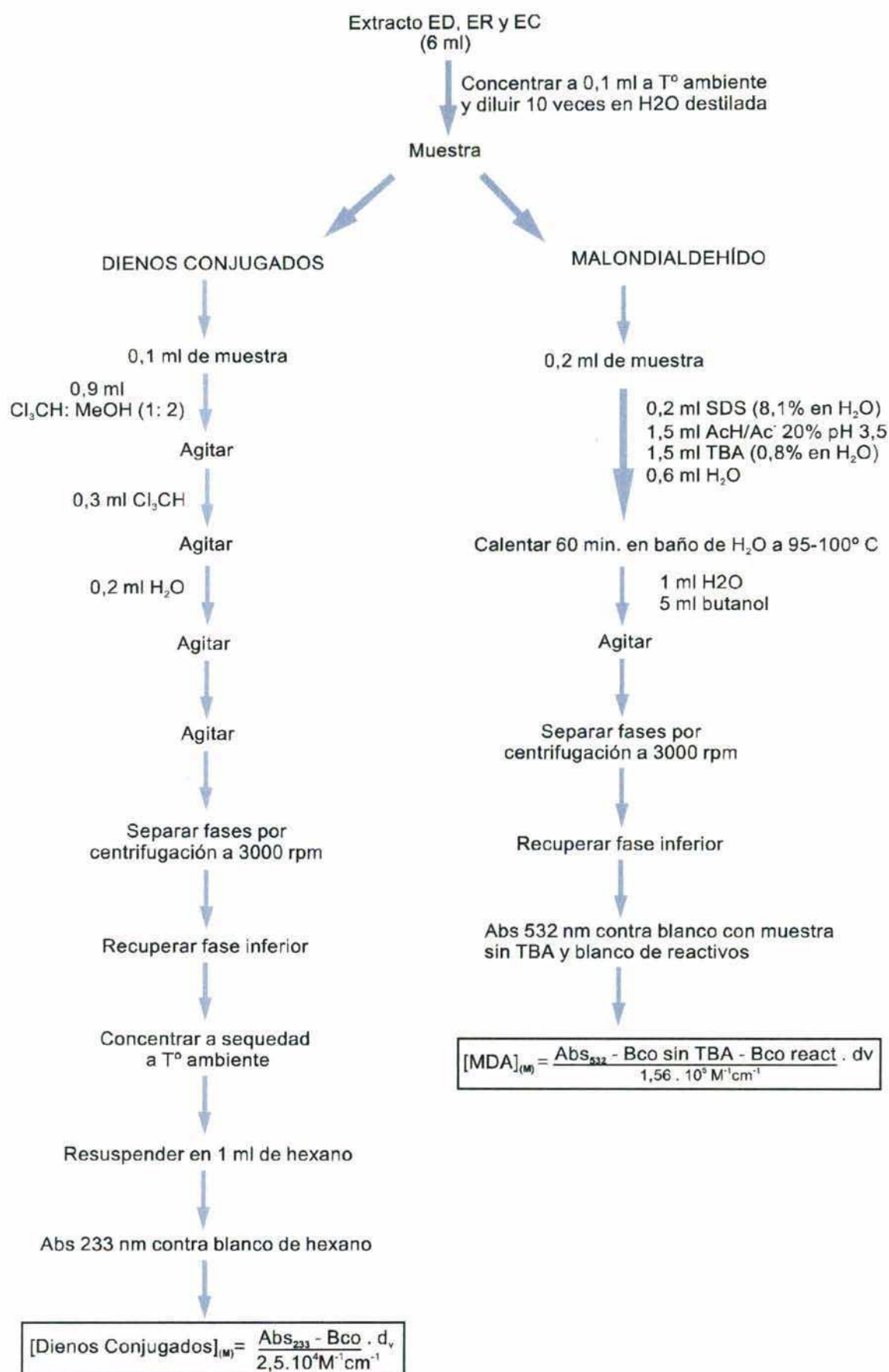


Figura 3. Protocolo para la determinación de metabolitos de origen lipídico en los extractos ED, ER y EC. dv: volumen final/volumen inicial.

III. C. 3. RESULTADOS

Para establecer si la acción terapéutica exhibida por el agua de la laguna puede deberse, en parte, a la existencia de sustancias antimicrobianas liberadas por la microalga dominante en ese cuerpo de agua (*C. kessleri*), se comparó el efecto antibiótico de extractos obtenidos a partir del agua de la laguna y de sobrenadantes de cultivos de *C. kessleri*, frente a microorganismos patógenos.

III. C. 3. 1. *Actividad antimicrobiana del agua de la Laguna Verde y de sobrenadantes de cultivos axénicos de C. kessleri en fase exponencial y estacionaria de crecimiento*

Los antibiogramas realizados con los extractos metanólicos y los extractos en acetato de etilo, obtenidos a partir del agua de la laguna y de los sobrenadantes de cultivos en fase exponencial y estacionaria, dieron resultados negativos. En cambio, los extractos etéreos presentaron actividad inhibitoria frente a *C. albicans* y *S. aureus* (Tabla 3). El extracto etéreo proveniente del agua de la laguna presentó la mayor actividad (Tabla 3 y Figura 4), seguido por el proveniente del cultivo en fase estacionaria de crecimiento (Tabla 3 y Figura 5), mientras que el obtenido del cultivo en fase exponencial dio como resultado los halos de inhibición más pequeños (Tabla 3 y Figura 5). Además, el extracto etéreo proveniente del cultivo estacionario presentó efectos antibacterianos y bacteriostáticos combinados frente a *S. aureus* (Tabla 3 y Figura 5).

La actividad antibiótica del extracto etéreo del agua de la laguna se mantuvo luego de 7 y 20 días de almacenamiento a 0°C, aunque los halos de inhibición obtenidos fueron de menor diámetro que los producidos por el extracto ensayado en el momento de su preparación (Tabla 3 y Figura 4).

Tabla 3. Actividad antibiótica de los extractos etéreos obtenidos a partir del agua de la Laguna Verde y de sobrenadantes de cultivos de *C. kessleri* en fase exponencial y estacionaria de crecimiento.

Fuente del extracto	Tiempo de almacenamiento (días)	Halo de inhibición (mm)	
		<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>
Cultivo exponencial	0	21	15
Cultivo estacionario	0	24	17*
Agua de la laguna ^a	0	30	51
	7	30	38
	20	24	31

Los extractos etéreos fueron preparados como se describe en el ítem III.C.2.1 de Materiales y Métodos. La actividad antibiótica se indica como el diámetro de los halos de inhibición. ^aLa actividad antibiótica del extracto del agua de la laguna fue ensayada en el momento de su preparación (0) y luego de siete (7) y veinte (20) días de almacenamiento a 0°C. *Presencia de un anillo bacteriostático adicional, de 13 mm de espesor.

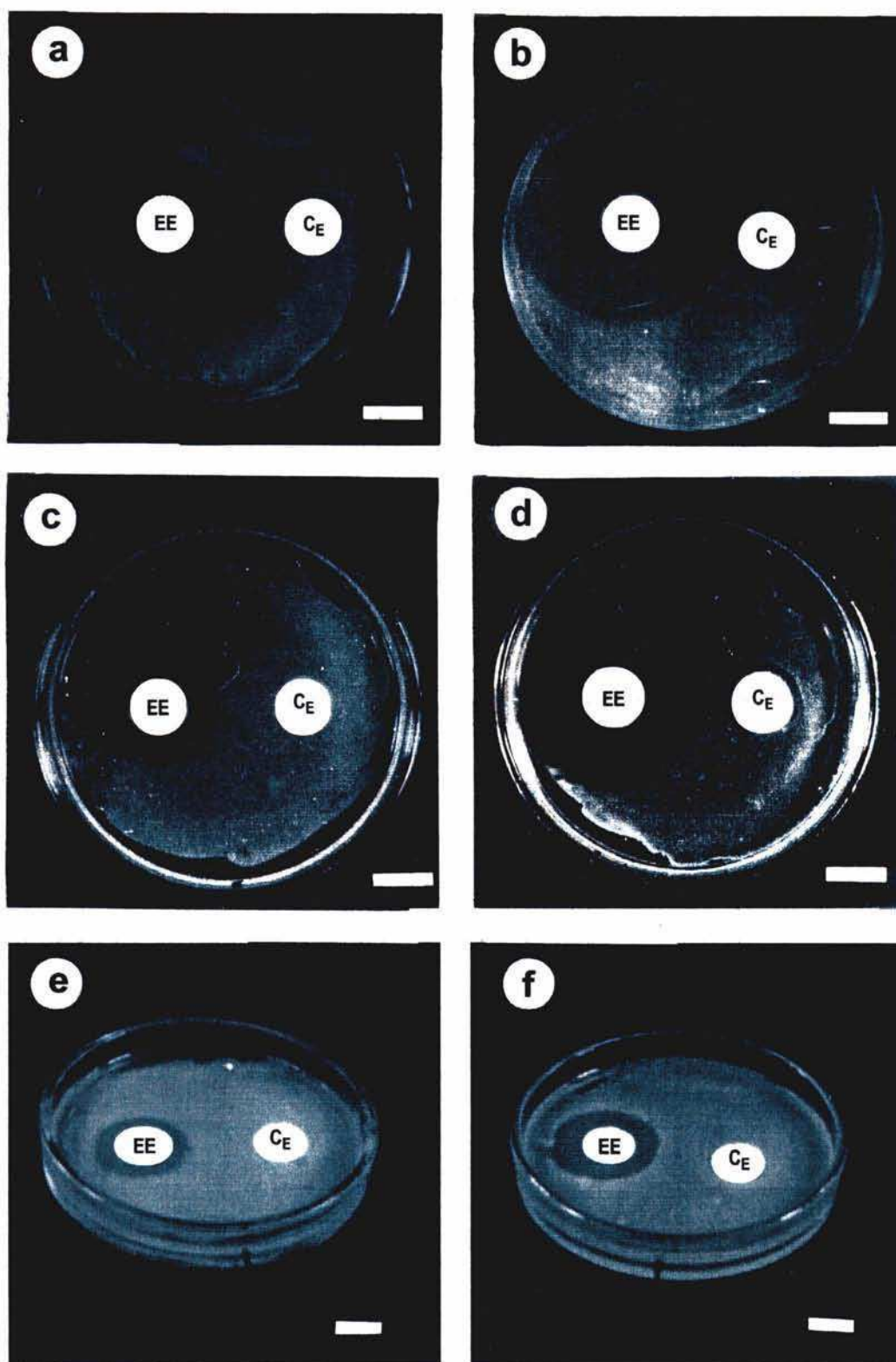


Figura 4. Antibiogramas del extracto etéreo (EE) obtenido a partir del agua de la Laguna Verde (según se describe en el ítem III.C.2.1) frente a *Candida albicans* (a, c y e) y a *Staphylococcus aureus* (b, d y f), luego de cero (a y b), siete (c y d) y veinte (e y f) días de almacenamiento a 0°C. C_E: control de éter. Las escalas corresponden a 15 mm.

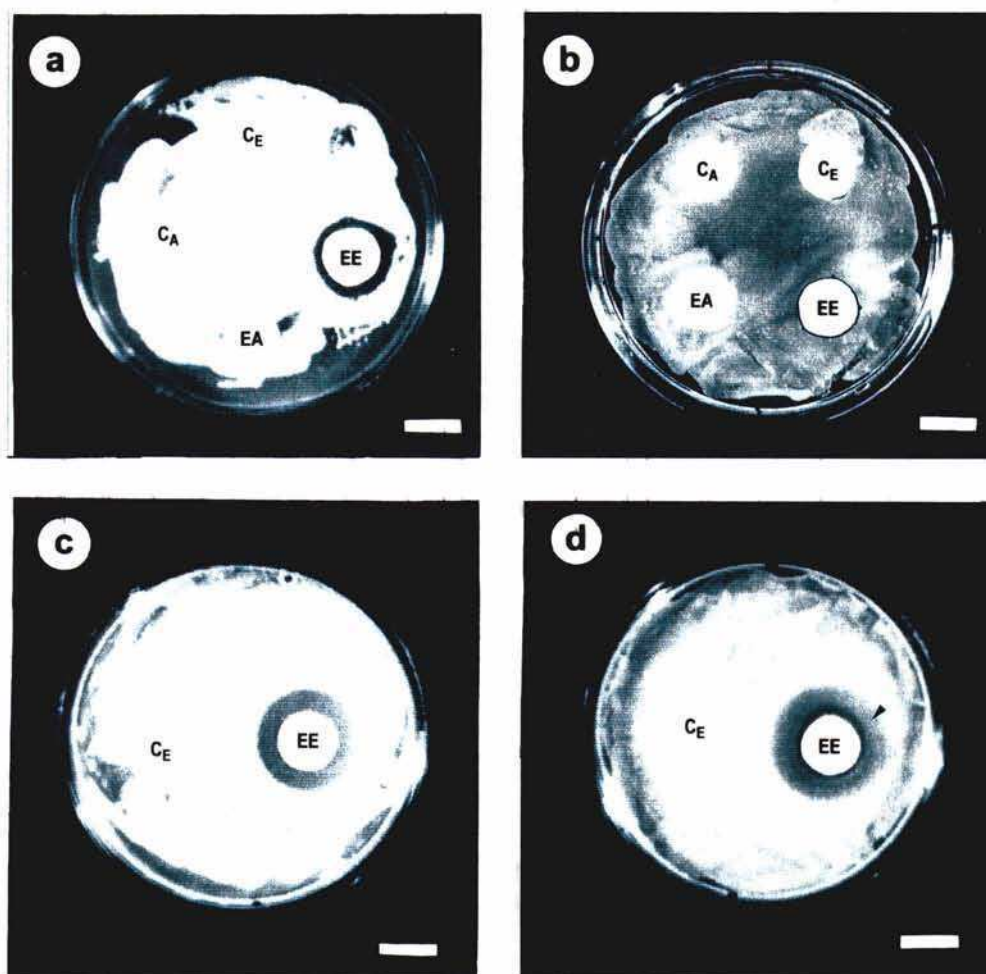


Figura 5. Antibiógramas de los extractos obtenidos a partir de los sobrenadantes de cultivos en fase exponencial y estacionaria de crecimiento (según se describe en el ítem III.C.2.1). a: extractos del cultivo en fase exponencial de crecimiento frente a *Candida albicans*. b: ídem (a) frente a *Staphylococcus aureus*. c: extracto etéreo del cultivo en fase estacionaria de crecimiento frente a *C. albicans*. d: ídem (c) frente a *S. aureus*. El extracto etéreo proveniente del cultivo en fase estacionaria de crecimiento presentó un anillo bacteriostático adicional de 13 mm de espesor (flecha). EE: extracto etéreo; EA: extracto en acetato de etilo; C_A: control de acetato de etilo; C_E: control de éter. Las escalas corresponden a 15 mm.

III. C. 3. 2. Actividad biológica de sobrenadantes de cultivos axénicos de *C. kessleri* en fase estacionaria de crecimiento

Una vez establecido que los extractos de *C. kessleri* más activos correspondían a los extractos etéreos obtenidos a partir de sobrenadantes de cultivos en fase estacionaria de crecimiento, se prepararon nuevos extractos en las condiciones detalladas en el ítem III C. 2. 2. La actividad antimicrobiana de los extractos EC, ED y ER obtenidos, se ensayó frente a 10 cepas de microorganismos y sus resultados se resumen en la Tabla 4. Los antibiógramas de los extractos ED y ER resultaron positivos contra todos los microorganismos ensayados (Tabla 4 y Figura

6), mientras que el extracto EC resultó inactivo. En todos los casos, los halos de inhibición producidos por el extracto ED fueron mayores que los producidos por el extracto ER (Tabla 4). La actividad antibiótica del extracto ED se mantuvo luego de 8 meses de almacenamiento a 0°C, aunque los halos de inhibición obtenidos fueron de menor diámetro que los producidos por el extracto ensayado en el momento de su preparación (Tabla 4).

Tabla 4. Actividad antibiótica de los extractos etéreos obtenidos a partir de sobrenadantes de cultivos de *C. kessleri* en fase estacionaria de crecimiento.

Microorganismo	Tiempo de almacenamiento	Halo de inhibición (mm)		
		ED	ER	EC
<i>Escherichia coli</i>	0	51 ^a	29	—
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	41 ^a	18	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	43	20	—
<i>Salmonella typhi</i>	0	55	32	—
<i>Bacillus anthraxis</i>	0	53 ^b	31	—
<i>Actinomyces sp.</i>	0	53	30	—
<i>Mycobacterium</i> grupo <i>Mac</i>	0	63	39	—
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	0	63	38	—
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	0	53	31	—
	8 meses	41		
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	47 ^b	22	—
	8 meses	21		

Los extractos etéreos fueron preparados por extracción directa sin (ED) o con concentración previa (EC), o por adsorción en resina XAD₂ (ER), como se describe en el ítem III.C.2.2 de Materiales y Métodos. La actividad antibiótica se indica como el diámetro de los halos de inhibición. ^aPresencia de un delgado anillo de inducción intermedio. ^bPresencia de un anillo bacteriostático adicional.

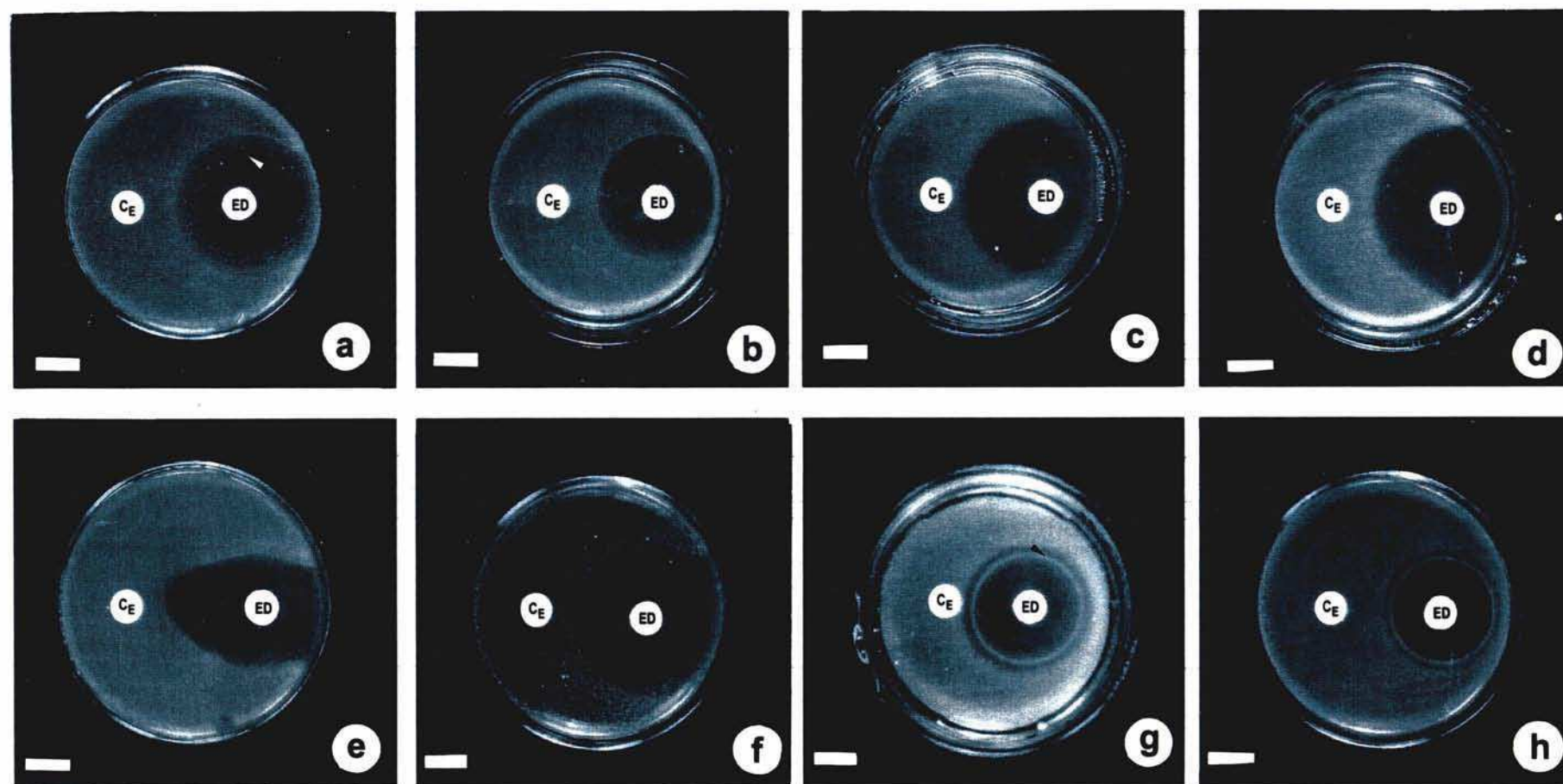


Figura 6. Antibiogramas del extracto ED (preparado de acuerdo a lo descrito en el ítem III.C.2.2) frente a algunos de los microorganismos estudiados. a: *Bacillus anthracis* (nótese la presencia de un anillo bacteriostático de 10 mm de espesor, flecha). b: *Staphylococcus aureus*. c: *Mycobacterium tuberculosis*. d: *M. grupo Mac*. e: *Actinomyces* sp. f: *M. fortuitum*. g: *Escherichia coli* (nótese la presencia de un doble halo determinado por un anillo de inducción intermedio, flecha). h: *Klebsiella pneumoniae* (nótese la presencia de un doble halo determinado por un anillo de inducción intermedio, flecha). C_E: control de éter. Las escalas corresponden a 20 mm.

III. C. 3. 3. *Análisis parcial de la composición química de los extractos*

Los análisis cromatográficos del extracto ED indicaron la presencia de sustancias con valores de R_f y propiedades cromogénicas similares a las correspondientes a ácidos grasos, lípidos insaturados y terpenoides (Tabla 5 y Figuras 7 y 8). Previamente al desarrollo de las cromatografías preparativas en papel, se corrieron cromatogramas con otros sistemas de solventes (Smith 1963; Stahl 1965): 1) butanol: ácido acético: agua (120:30: 50, v/v) indicado para ácidos orgánicos y fenoles; 2) metanol: cloroformo (1: 4, v/v) indicado para fosfolípidos; 3) hexano: acetato de etilo (90:10, v/v) para terpenoides; 4) ciclohexano: cloroformo (80: 20, v/v, saturado con ácido fórmico), para terpenoides. Las resoluciones de dichos cromatogramas no resultaron apropiadas, obteniéndose poca separación de los componentes. Finalmente, utilizando éter de petróleo: metanol: ácido fórmico (50: 5: 45, v/v) como solvente de desarrollo, se obtuvo una buena separación de los componentes que se revelaron con distintos reactivos, como se indica en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultado de las distintas detecciones químicas ensayadas en la cromatografía preparativa en papel y en la cromatografía en placa delgada del extracto ED.

Reactivo	Especificidad	Resultado
Verde de bromocresol	ácidos grasos no saturados	+
Azul de bromofenol	derivados de purinas y pirimidinas	+
Ácido tricloroacético	esteroides	—
Ácido fosfomolibdico	esteroides, lípidos conteniendo colina, lípidos insaturados	+
Rodamina B	fosfolípidos y lípidos en general	+
Iodo	lípidos, especialmente insaturados	+
Ninhidrina	aminoácidos, fosfolípidos, aminolípidos	—
Reactivo de Schiff	fosfolípidos, específicamente glicolípidos y aminolípidos	—
Cloruro férrico	fenoles	—
Nitrato de plata	azúcares, fenoles	—
Ácido sulfúrico conc.	terpenoides	+

Las cromatografías fueron desarrolladas como se indica en Materiales y Métodos (ítem III.C.2.4), aplicando los reveladores de acuerdo a Smith (1963), Stahl y Jork (1965), White y James (1985) y Kates (1988).

Los biocromatogramas realizados con las secciones de papel cromatográfico desarrollado, demostraron antibiosis frente a *S. aureus* en la zona de R_f 0,85 a 0,95. De acuerdo con los reactivos ensayados, esta zona correspondería a ácidos grasos no saturados (Figura 7). En tanto que los biocromatogramas realizados con los distintos sectores eluidos de la placa de sílica desarrollada, resultaron negativos.

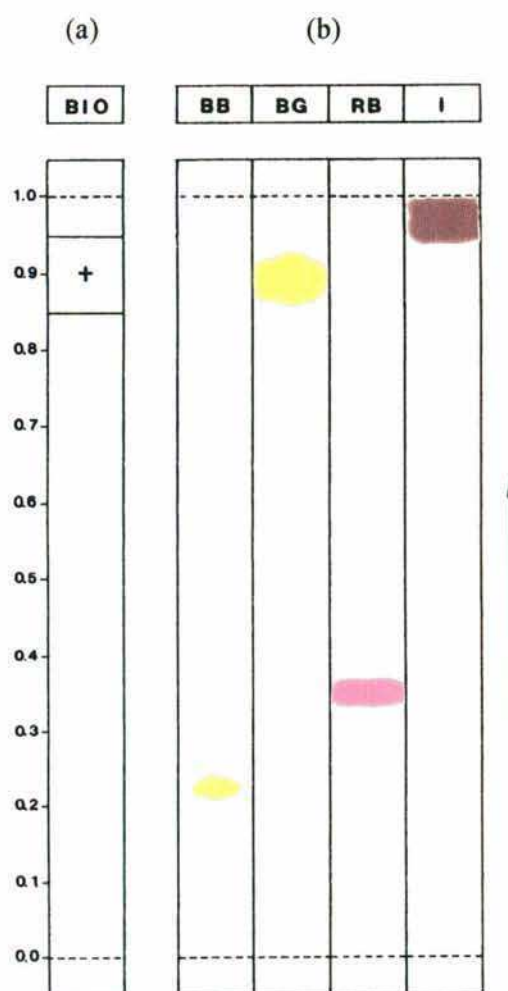


Figura 7. Biocromatogramas (a) y Cromatografía preparativa en papel Whatman 3MM (b) del extracto ED. Reveladores: azul de bromofenol (BB); verde de bromocresol (BG); rodamina B (RB); iodo (I). BIO: biocromatogramas. +: antibiosis positiva frente a *S. aureus* (área de inhibición de 20 mm de espesor).

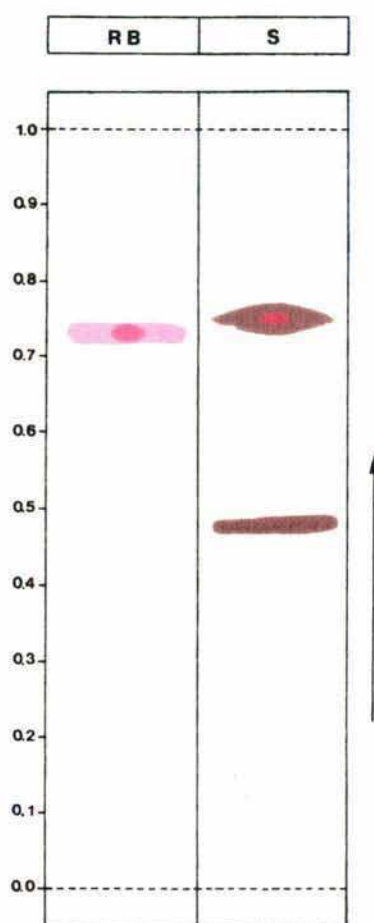


Figura 8. Cromatografía en placa delgada del extracto ED. Reveladores: rodamina B (RB) y ácido sulfúrico concentrado (S).

En la Figura 9 se presenta la composición de los extractos activos (ED y ER) y del extracto inactivo (EC). El extracto ED presentó el doble de contenido en malondialdehído, hidratos de carbono y proteínas que el extracto ER. En tanto que el contenido de dienos conjugados encontrado en ese mismo extracto fue diez veces mayor que el encontrado en ER. Por otro lado, el extracto inactivo EC, fue el que presentó el menor contenido de todas las sustancias determinadas (Figura 9).

Se realizó la extracción clorofórmica de pigmentos tetrapirrólicos a partir del extracto activo ED. El análisis por HPLC mostró que el extracto contenía más de un 95% de protoporfirina y trazas de heptacarboxiporfirina y uroporfirina.

Los antibiogramas realizados aplicando este extracto clorofórmico, resultaron negativos. Antibiogramas paralelos aplicando prototoporfirina pura o cloroformo, utilizados como control, también dieron resultados negativos.

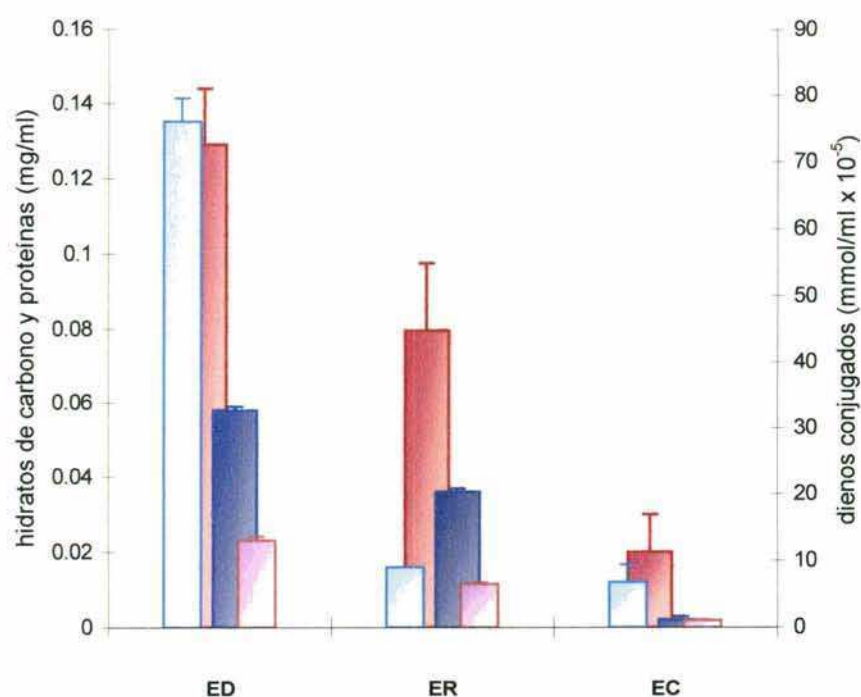


Figura 9. Contenido de hidratos de carbono (■), proteínas (■), dienos conjugados (■) y MDA (■), de los extractos activos (ED y ER) e inactivo (EC).

III. C. 4. DISCUSION

Como ya se especificara en la Introducción, las aguas de la Laguna Verde son utilizadas con fines terapéuticos, incluyendo el tratamiento de afecciones cutáneas producidas por algunos microorganismos patógenos. Se decidió, entonces, analizar la posibilidad de que su acción terapéutica se deba, en parte, a la producción y liberación de sustancias antimicrobianas por parte de *C. kessleri*, microalga dominante en ese cuerpo de agua (Juárez y Vélez 1993).

Los ensayos realizados, indicaron que tanto los extractos etéreos obtenidos a partir del agua de la laguna como los obtenidos a partir de los sobrenadantes de cultivos de *C. kessleri*, poseen actividad antibiótica frente a los microorganismos ensayados (Tabla 3 y Figuras 4 y 5). El efecto antibiótico de estos últimos, indica la producción y liberación de principios antimicrobianos por parte de *C. kessleri*. Dada la elevada concentración de *C. kessleri* en la laguna, del orden de 2×10^7 células/ml (Juárez y Vélez 1993), puede suponerse que estos compuestos podrían estar relacionados con los efectos curativos de las aguas naturales frente a ciertas dolencias epidérmicas como psoriasis, candidiasis, dermatitis, etc. Por otra parte, dado que se evidenció la liberación de metabolitos bioactivos, no puede descartarse la posibilidad de que entre ellos se encuentren compuestos que, además, sean activos frente a otros organismos. Como ha sido comprobado por distintos autores (Fogg 1971; Hellebust 1974), las algas producen una variedad de metabolitos extracelulares, que juegan un importante papel en la composición de la comunidad de un ecosistema acuático, pudiendo determinar la dominancia de una especie en ese ambiente (Hellebust 1974). Por lo que, teniendo en cuenta los fenómenos de alelopatía (Rice 1984), la producción de metabolitos biológicamente activos podría explicar, en parte, la dominancia de *C. kessleri* en la Laguna Verde. Sin embargo, también se deben tener en cuenta las condiciones particulares de este cuerpo de agua de origen termal (principalmente su bajo pH y alta temperatura, ítem I.2.1 del capítulo I), que, sumado a lo anterior, podrían permitirle a esta microalga ser la especie dominante.

Dado que la mayoría de los registros de compuestos bioactivos corresponden a sustancias de naturaleza liposoluble, para la preparación de los extractos extracelulares, se optó por realizar una marcha general, usada normalmente para la extracción de sustancias bioactivas de plantas y algas, que corresponde a una extracción secuencial con solventes de polaridad decreciente

(Veerport 1998). Los extractos obtenidos con los solventes más polares resultaron inactivos, mientras que los extractos etéreos fueron los únicos que presentaron actividad antibiótica. El éter etílico extrae la mayor parte de los lípidos neutros (Kates 1988), aunque normalmente los extractos obtenidos también contienen aminoácidos, péptidos, azúcares y otros productos neutros hidrofílicos que son arrastrados conjuntamente con ellos (Mangold 1965). La detección de actividad antimicrobiana únicamente en los extractos etéreos daría un primer indicio de que el mayor componente de los compuestos antibióticos, presentes en los sobrenadantes de cultivos y en el agua de la laguna, correspondería a sustancias de naturaleza lipídica. Aunque no puede descartarse la actividad antimicrobiana de compuestos polares que se encontrarían en una concentración muy baja.

Cuando se comparan los efectos del extracto etéreo obtenido a partir del agua de la laguna con los de los extractos obtenidos a partir de sobrenadantes de cultivos de *C. kessleri*, se observa que la mayor actividad antimicrobiana corresponde al extracto proveniente del agua de la laguna, seguido por los de los sobrenadantes de cultivos en fase estacionaria y exponencial de crecimiento (Tabla 3). La mayor actividad antibiótica obtenida con el extracto mencionado en primer término, podría relacionarse con el alto volumen de agua filtrado *in situ* (20 l), con el mayor acúmulo natural de metabolitos bioactivos en función del tiempo y con la probable producción de sustancia extracelulares por parte de las especies coexistentes. Por otro lado, debe tenerse en cuenta la proporción de células muertas en el ambiente natural, ya que la pérdida de contenido celular por muerte o autólisis, podría aumentar la concentración de metabolitos en el medio (Hellebust 1974). Comparando los resultados obtenidos con los extractos de cultivos en fase exponencial y estacionaria de crecimiento, se observa que el efecto inhibitorio frente a *S. aureus* y *C. albicans* fue mayor con el extracto del cultivo estacionario. Se ha informado que la producción de metabolitos extracelulares bioactivos depende de la etapa de crecimiento (Giordano *et al.* 1994; Burkiewicz y Synak 1996) y es mayor en cultivos envejecidos (Allard y Tazi 1993), lo cual puede estar relacionado con la deficiencia de nitrógeno y fósforo en esas condiciones (Strycek *et al.* 1992; Rapala *et al.* 1993). Incluso Pratt (1948), específicamente ha informado que la clorelina extracelular producida por *C. vulgaris*, que posee propiedades antimicrobianas, se acumula en los cultivos en fase estacionaria de crecimiento. Además, dado que generalmente es difícil tener la certeza de la ausencia de células muertas en cultivos de crecimiento rápido (Aaronson *et al.* 1971), la autólisis celular podría incrementar la concentración de metabolitos en el medio, entre los que

pueden encontrarse los principios antimicrobianos, y ello explicaría, en parte, el incremento de la actividad inhibitoria durante la fase estacionaria de crecimiento.

En estos primeros ensayos, se pudo comprobar que, tanto el extracto del agua de la laguna como los extractos de los sobrenadantes de los cultivos de *C. kessleri*, poseen actividad antimicrobiana. Dado que el extracto obtenido a partir del sobrenadante de cultivo en fase estacionaria resultó ser el más activo, se ensayó, específicamente, el efecto de extractos provenientes de cultivos en esta fase de crecimiento. Como normalmente la concentración de metabolitos liberados al medio de cultivo es muy baja, además de la extracción directa con el solvente, se probaron dos métodos tendientes a la concentración de los metabolitos y se ensayó la actividad antimicrobiana de los tres extractos obtenidos. Al comparar los resultados de los antibiogramas realizados con estos extractos, frente a diez cepas de microorganismos patógenos (Tabla 4), se observa que el extracto directo (ED) es el más activo, seguido por el extracto obtenido mediante elución de la columna de adsorción XAD₂ (ER), mientras que el extracto concentrado previamente a 50°C (EC) no presentó actividad. Esto indicaría que la adsorción en resina XAD₂ no resultaría ser un método eficiente para la concentración de este tipo de metabolitos en particular y que la aplicación de temperatura parece dañar los metabolitos presentes en el mismo, llevando a la pérdida de actividad antimicrobiana del extracto EC. Este último resultado indica que los principios activos presentes en el extracto serían termolábiles, en concordancia con lo informado para los metabolitos extracelulares bioactivos clorelina y scenedesmina, extraídas con éter etílico en cultivos de *Chlorella vulgaris* y en cultivos de *Scenedesmus acutus* y *Scenedesmus obliquus*, respectivamente (Accorinti 1981). Tomando en cuenta los resultados comentados, si se desean obtener extractos más concentrados, que permitan futuros estudios de fraccionamiento e identificación de los principios activos, se deberán implementar métodos no invasivos de concentración, de manera de no alterar las sustancias activas (por ej., empleo de filtros con presión positiva).

Para analizar la naturaleza de los compuestos presentes en estos tres extractos, se determinó el contenido de proteínas, hidratos de carbono y derivados lipídicos. Para esto último, se estimaron el contenido de dienos conjugados y el contenido de MDA, ya que además de ser más sensibles que el método gravimétrico (Kates 1988), se ha informado que los principios antimicrobianos de *C. vulgaris* podrían corresponder a lípidos insaturados o a peróxidos de lípidos (Telitchenko 1974; Accorinti 1981). Estos últimos compuestos, al igual que las especies

aquí determinadas, están asociados a procesos de peroxidación lipídica. Al comparar el contenido de los tres extractos (Figura 9), se observa que el extracto EC presentó la menor concentración de todos los compuestos estimados. Es probable que el bajo nivel de metabolitos en este extracto sea el motivo de la falta de efecto sobre los microorganismos ensayados. Esto, sumado a la posibilidad de que los principios biactivos sean termolábiles, podría explicar la ausencia de actividad antibiótica en el mismo. Por otra parte, el extracto activo ED presentó la mayor concentración de todos los compuestos estimados, siendo la concentración estimada de dienos conjugados y la concentración de MDA, diez veces y dos veces mayor, respectivamente, que la del extracto ED. Dado que la actividad biológica de distintos extractos algales se ha asociado a compuestos de naturaleza lipídica, ello podría explicar la mayor actividad antimicrobiana de este extracto. Un posterior análisis fino de la composición lipídica, posiblemente permita identificar el/los principios activos de estos extractos.

Los resultados obtenidos en los antibiogramas, indican claramente que *Chlorella kessleri* produce metabolitos con actividad antibiótica contra los once microorganismos patógenos ensayados. Frente a algunos de estos microorganismos, se observaron efectos combinados: efecto antibacteriano y bacteriostático frente a *Staphylococcus aureus* (Tabla 3 y Figura 5 d), y efecto inductor y antibacteriano frente a *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* (Tabla 4 y Figura 6 g y h). Estos resultados podrían indicar la existencia de, al menos, dos principios activos con distinta velocidad de difusión y/o distinta actividad biológica. Los ensayos de estabilidad al almacenamiento, realizados con el extracto del agua de la laguna y con el extracto del cultivo en fase estacionaria de crecimiento, indicarían que los principios activos implicados serían medianamente estables, ya que la actividad antibiótica se mantuvo luego de 20 días y de 8 meses de almacenamiento a 0°C, respectivamente, aunque perdiendo, en parte, su poder inhibitorio (halos de inhibición de menor diámetro).

Los ensayos de actividad biológica de las fracciones extracelulares de los cultivos axénicos de *C. kessleri*, realizados en este trabajo de tesis, mostraron efectos antibióticos frente a once microorganismos patógenos, cinco de los cuales no habían sido ensayados previamente con extractos extracelulares ni de ésta ni de otras especies de *Chlorella* (Tabla 1). Es importante destacar, que los extractos etéreos de *C. kessleri* presentaron una intensa acción inhibitoria contra tres cepas altamente patógenas y resistentes a las drogas antibacilares utilizadas en los

tratamientos clínicos (Tabla 4 y Figura 6 c, d y f). La cepa de *M. tuberculosis*, utilizada en este estudio, corresponde a una mutante resistente, mientras que las cepas de *M. fortuitum* y *M. grupo Mac* corresponden a especies de micobacterias no tuberculosas (atípicas), cuya particularidad es la resistencia a las drogas antibacilares (Tabla 2). Dentro de las especies atípicas, estas dos especies son unas de las más aisladas en nuestro país, principalmente en enfermos de SIDA. Esto último destaca la importancia de los resultados obtenidos y sugiere la posibilidad del uso de cultivos de *C. kessleri* en el desarrollo de productos de alto interés farmacológico.

Diversos autores han realizado estudios para identificar la naturaleza química de los principios activos producidos por las algas. Entre los metabolitos identificados se encuentran compuestos aromáticos y alifáticos, lípidos insaturados, lípidos peroxidados, ácidos grasos, glicolípidos, polisacáridos y otros carbohidratos, péptidos, fenoles, bromofenoles, terpenoides, alcaloides y derivados de clorofila. En el caso específico del género *Chlorella*, se ha informado que la clorelina extracelular, soluble en éter etílico y otros solventes orgánicos (Pratt 1944; Jorgensen 1962), posee propiedades antibacterianas, se acumula principalmente en la fase estacionaria de crecimiento (Pratt 1948) y podría corresponder a peróxidos de lípidos (Telitchenko 1974). Los resultados obtenidos en la determinación de derivados lipídicos del extracto ED, mostraron altos valores de dienos conjugados y de MDA. Teniendo en cuenta que estos compuestos corresponden a los primeros y a los últimos productos en la cadena de peroxidación lipídica, es probable que los peróxidos lipídicos también se encuentren en altas concentraciones en el extracto de *C. kessleri*. Ello sugeriría que estos compuestos podrían estar involucrados entre los principios activos del extracto extracelular de *C. kessleri*, al igual que lo informado para el extracto de clorelina extracelular, con el que comparte varias características similares (solubilidad en éter etílico, acumulación en fase estacionaria, actividad antibacteriana). También se ha relacionado a la clorelina y a otros principios activos extracelulares de este género y de otras algas con ácidos grasos no saturados (Accorinti 1981). Los resultados de los análisis cromatográficos del extracto de *C. kessleri* aquí presentados (Tabla 5 y Figuras 7 y 8), indicarían la presencia de lípidos insaturados, ácidos grasos no saturados y terpenos. Estos últimos compuestos, también han sido identificados como compuestos bioactivos producidos por algunas algas (Accorinti 1987b). Analizando en conjunto los resultados de las cromatografías y de los biocromatogramas (Figura 7), el/los principio/s activo/s del extracto de *C. kessleri* corresponderían, principalmente, a ácidos grasos no saturados, ya que los

biocromatogramas realizados con las secciones de papel cromatográfico desarrollado, dieron antibiosis positiva en la zona correspondiente a dichas sustancias (R_f 0,85 a 0,95, positivo con verde de bromocresol). Si bien, en la cromatografía en placa delgada (Figura 8) se detectaron sustancias terpenoides, los biocromatogramas realizados con la zona de sílica correspondiente a ese R_f resultaron negativos, posiblemente debido a que estos compuestos se encontraban en una concentración muy baja en el eluido aplicado en los antibiogramas, la cual podría ser insuficiente como para ejercer un efecto inhibitorio sobre los microorganismos ensayados. De todas maneras, tampoco puede descartarse la posibilidad de que estos compuestos necesiten la acción sinérgica de otros. Por otra parte, si bien se detectaron compuestos tetrapirrólicos (casi exclusivamente protoporfirina) en el extracto crudo, la fracción correspondiente tampoco presentó actividad antimicrobiana. Los resultados negativos obtenidos en los antibiogramas realizados con protoporfirina pura, demuestran que la protoporfirina presente en los sobrenadantes de estos cultivos no sería la responsable de su actividad. Algunos trabajos han informado que ciertos compuestos bioactivos de *Chlorella* y otras algas corresponderían a derivados de clorofila y de otros pigmentos (Accorinti 1981; Romero López y Pérez Hernández 1999). En dichos trabajos se analizaron extractos celulares, los cuales contienen altas concentraciones de pigmentos. En cambio, en este caso de *C. kessleri*, se analizaron extractos extracelulares donde la concentración de pigmentos será muy baja, lo cual podría determinar la falta de detección de actividad antibiótica.

Muchas drogas existentes en el mercado farmacéutico provienen directamente de fuentes naturales, o han sido sintetizadas en base a las estructuras químicas y propiedades de las moléculas encontradas en la naturaleza. Se ha estimado que, de alrededor de 520 nuevas entidades químicas aprobadas por las agencias regulatorias en el mundo en los últimos 11 años, cerca del 50% provienen de fuentes naturales. Además, la resistencia que presentan muchos microorganismos patógenos a los antibióticos disponibles actualmente, ha llevado a los investigadores a intensificar los estudios sobre la producción de compuestos antimicrobianos en plantas, pero también se ha derivado a la búsqueda de este tipo de compuestos en organismos no explorados. Por lo que todo aporte tendiente a la búsqueda de nuevas fuentes de compuestos bioactivos es de gran interés. Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, demuestran que la cepa BAFC CA10 de *Chlorella kessleri* produce y libera metabolitos que poseen actividad antimicrobiana. Incluso, se encontró que presentan fuertes efectos inhibitorios contra cepas de microorganismos causantes de graves enfermedades infecciosas y altamente

resistentes a las drogas antibacilares de uso clínico en la actualidad (*Mycobacterium* spp.). Ello destaca la importancia de estos estudios preliminares, ya que sugiere la posibilidad de la aplicación de *C. kessleri* como posible productora de antibióticos de origen natural y abre un camino para continuar con investigaciones tendientes al fraccionamiento, aislamiento e identificación de los metabolitos involucrados, que puedan ser producidos y utilizados en la industria farmacéutica. Tanto *C. kessleri* como otras microalgas de agua dulce, pueden cultivarse fácilmente y rendir grandes biomásas, sin requerir el uso de medios orgánicos caros y laboriosos, lo que representa una importante ventaja para la investigación y producción comercial de sustancias farmacológicamente activas. Por otra parte, dado que la síntesis y la excreción de metabolitos en las algas dependen del balance entre la producción y la utilización de sus productos fotosintéticos (Borowitzka y Borowitzka 1988), encontrándose involucrada la regulación de la síntesis de clorofila, el estudio sobre ese camino, realizado en el capítulo anterior, puede ayudar a la comprensión y al manejo de la producción de dichos metabolitos.

III. C. 5. CONCLUSIONES

En esta sección se presentaron los resultados obtenidos al estudiar la actividad antimicrobiana de extractos del agua de la Laguna Verde y de cultivos de la cepa BAFC CA10 de *C. kessleri*. Dichos resultados demuestran la factibilidad del uso de *C. kessleri* en estudios de producción de compuestos útiles para el hombre y, en base a ellos puede concluirse que:

- ❖ Las aguas de la Laguna Verde y los sobrenadantes de cultivos de esta cepa de *C. kessleri* poseen principios antimicrobianos, activos frente a distintos microorganismos patógenos.
- ❖ Los extractos de los sobrenadantes de cultivos de *C. kessleri* poseen actividad antimicrobiana frente a varios microorganismos patógenos, que incluyen bacterias causantes de enfermedades altamente infecciosas, multirresistentes a las drogas antibacilares y con alta incidencia en la salud humana (*M. tuberculosis*, *M. fortuitum*, *M. grupo Mac*).
- ❖ Esta cepa de *C. kessleri* produce y libera al medio, principios bioactivos, con actividad antibiótica frente a 11 microorganismos patógenos. Dada la alta dominancia de *C. kessleri* en la Laguna Verde, estos principios bioactivo pueden estar implicados en la actividad antimicrobiana de las aguas de la laguna.
- ❖ Los extractos de los sobrenadantes de cultivos de *C. kessleri*, presentarían dos o más principios activos con diferente velocidad de difusión y/o distinta actividad biológica, medianamente estables al almacenamiento a 0°C y termolábiles.
- ❖ El/los principio/s activo/s de los extractos de *C. kessleri* corresponderían, principalmente, a ácidos grasos no saturados, aunque no puede descartarse la posible influencia de peróxidos de lípidos y de terpenoides, los cuales han sido informados como compuestos bioactivos en otras algas.
- ❖ Si bien se trata de un estudio preliminar, los resultados obtenidos demuestran la potencialidad de los cultivos de *C. kessleri* para la extracción, aislamiento e identificación de metabolitos farmacológicamente activos de alto interés, que puedan ser producidos y utilizados en la industria farmacéutica.

ALCANCES Y PERSPECTIVAS FUTURAS DEL TRABAJO

En este trabajo de tesis, se realizaron los siguientes trabajos, cuyos resultados tienen relevancia a nivel de distintas áreas del conocimiento de la biología de las microalgas:

- ❖ Se caracterizó una cepa autóctona de *Chlorella kessleri*. Su hallazgo representa una nueva cita de esta especie para la Argentina y su segundo registro a nivel mundial en un ambiente natural. Adicionalmente, el hallazgo de *C. kessleri* en un cuerpo de agua de origen volcánico, constituye un nuevo registro de una especie de *Chlorella* en este tipo de ambientes y, la caracterización de esta cepa, contribuye al conocimiento de la biología de microalgas provenientes de ellos.
- ❖ Se estudió la actividad de dos enzimas involucradas en el primer paso regulatorio del camino biosintético de las clorofilas (ALAS y DOVAT) y se estudió y caracterizó la enzima del segundo paso regulatorio clave (UroD). La regulación de la síntesis de clorofila está involucrada en el balance entre la producción y utilización de productos fotosintéticos, del cual depende la síntesis de metabolitos y el crecimiento de las algas. Los estudios sobre las enzimas involucradas en la biosíntesis de este compuesto, como el realizado aquí, contribuyen a un mejor entendimiento del metabolismo algal y al manejo de la optimización de los cultivos de microalgas, en función de la producción de determinados metabolitos de interés.
- ❖ Adicionalmente, la enzima UroD es uno de los blancos de acción de diversos xenobióticos del tipo de los HAPs y de algunos metales pesados. Se realizó por primera vez la caracterización parcial de esta enzima y se mostraron las condiciones óptimas para la determinación de su actividad en *Chlorella kessleri*, sentando las bases para su determinación en microalgas.
- ❖ Se estudiaron dos aspectos importantes de la biología aplicada de las microalgas: 1) La potencial aplicación de esta cepa y alguna de sus propiedades como índice de contaminación ambiental con metales y xenobióticos. 2) La potencialidad de esta cepa como fuente de compuestos biológicamente activos. En relación con el primer aspecto, se

analizó el efecto de un metal pesado (cobre) y un xenobiótico (HCB) sobre la actividad UroD. La importancia de evaluar procesos enzimáticos radica en que las concentraciones subletales de contaminantes pueden no llegar a tener efectos observables sobre el crecimiento de los cultivos, pero, sin embargo, pueden afectar procesos metabólicos vitales, como pasos claves de la biosíntesis de la clorofila. Los resultados obtenidos, demuestran que la determinación de la actividad UroD puede constituir un biomarcador de la contaminación reciente con HAPs y de la toxicidad de niveles de cobre (y/u otros metales pesados) que no alcanzan a producir efectos ponderables sobre el crecimiento algal. En relación con el segundo aspecto, se analizó la actividad antimicrobiana de extractos extracelulares provenientes de esta cepa, detectándose actividad inhibitoria contra once cepas de microorganismos patógenos, incluyendo tres cepas altamente resistentes a las drogas de uso clínico actual. Los resultados obtenidos muestran la potencialidad de los cultivos de *C. kessleri* para la extracción, aislamiento e identificación de metabolitos farmacológicamente activos de alto interés, que puedan ser producidos y utilizados en la industria farmacéutica.

Teniendo en cuenta los resultados surgidos de este trabajo y las características y ventajas de los cultivos de microalgas, se planea continuar con las siguientes líneas de investigación:

- ❖ Estudiar el mecanismo de decarboxilación del Urogen III en algas, como sistema alternativo al empleo de animales.
- ❖ Estudiar las restantes enzimas de el camino biosintético de la clorofila, como así también las del catabolismo de los tetrapirroles, para tener un panorama más completo del metabolismo algal y de su regulación.
- ❖ Continuar con el estudio de la respuesta de la UroD al tratamiento de los cultivos con distintos contaminantes ambientales (metales e hidrocarburos). Por ejemplo, para estudiar el efecto de la contaminación por HCB a largo plazo y su incidencia en el ecosistema acuático, se aplicarán otras estrategias de análisis, como el seguimiento de los cultivos bajo un agregado periódico del tóxico al medio y el análisis del efecto del HCB en una cadena trófica.

- ❖ Iniciar estudios sobre estrés oxidativo en algas, focalizando la atención en la vía metabólica de los tetrapirroles. De acuerdo con los resultados de este trabajo, esta cepa de *C. kessleri* toleraría concentraciones de cobre más elevadas que las informadas para otras especies del género *Chlorella*. Ello podría indicar la existencia de un mecanismo de detoxificación más eficiente. Los resultados también indicarían la probabilidad de que esta cepa cuente con mecanismos de detoxificación (repuesta antioxidante y metabolización del contaminante) que permitan la eliminación del HCB en corto tiempo. Por lo que resulta interesante continuar con el análisis de los mecanismos involucrados, mediante estudios de determinación de los niveles intracelulares de proteínas quelantes y estudios sobre marcadores de respuesta antioxidante (nivel de glutathion, ascorbato y fenoles, nivel de actividad de catalasa, superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa y glutathion peroxidasa). Para la determinación fehaciente de la capacidad de metabolización del HCB por parte de *C. kessleri*, se continuará con estudios que involucrarán la determinación de productos catabólicos de este compuesto y la determinación de las actividades de enzimas implicadas en el metabolismo de xenobióticos (citocromo P₄₅₀, dioxigenasa y glutathion-S-transferasa).
- ❖ Estudiar si distintos efectores de las enzimas del camino metabólico de los tetrapirroles, pueden favorecer la producción de los metabolitos bioactivos que han sido detectados en este trabajo.

Dña. MARIA S. VIGNA

Dra. M. C. RIOS DE MOLINA
QUÍMICA BIOLÓGICA

Lic. Angela B. Juárez

BIBLIOGRAFÍA

- Aaronson, S., De Angelis, B., Frank, O. y Baker, H. 1971. Secretion of vitamins and aminoacids into the environment by *Ochromonas danica*. *J. Phycol.* 7: 215-218.
- Accorinti, J. 1980. Ensayos de aislamiento e identificación de productos extracelulares biológicamente activos de cultivos axénicos de *Coelastrum proboscideum* var. *dilatatum* (Chlorophyta). III. Nuevos cultivos en DPG: Liofilización a pH natural. 2. Investigación de fosfolípidos y nucleótidos. *Phyton*, 39: 21-35.
- Accorinti, J. 1981. Inhibidores antibacterianos y de otros microorganismos producidos por algas chlorococcales. *Physis (Buenos Aires)*, Secc. B., 39 (97): 67-77.
- Accorinti, J. 1987a. Antimicrobial substances from marine dinoflagellates 4-TLC qualitative isolation and identification assays of anti-*Candida albicans* factor from *Gonyaulax tamarensis* Lebour. *Rev. Int. D' Oceanogr. Med.*, 87/88: 33-41.
- Accorinti, J. 1987b. Recursos marinos: algas, fuente potencial de nuevos fármacos. 1. Terpenoides y metabolitos relativos. *Inst. Antártico Arg. 18, Dir. Nac. Inst. Antártico Arg.*, 131 pp.
- Accorinti, J. y Rodríguez, M. C. 1988. Paper chromatographic characterization of an extracellular biologically active compound from *Coelastrum proboscideum* var. *dilatatum*. *Cytobios.*, 56: 157-162.
- Accorinti, J., Rodríguez, M. C., Wachsmann, M. B. y Coto, C. E. 1983. Antiviral extracellular extract from *Coelastrum proboscideum* var. *dilatatum* (Chlorophyta: Chlorococcal) axenic culture. *Fitoterapia*, 54 (2): 71-74.
- Agrawal, M. y Kumar, H.D. 1978. Physi-chemical and phycological assesment of two mercury-polluted effluents. *Indian J. Environ. Health*, 20: 141-155.
- Ahmed, Z. A. y Abdel-Basset, R. 1992. Growth, photosynthesis, and proline content of *Scenedesmus obliquus* (Turp.) Kutz. as affected by Cu^{2+} . *Acta Hydrobiol.*, 34: 401-409.
- Ahner, B. A., Kong, S. y Morel, F. M. 1995. Phytochelatin production in marine algae: I. An intraspecies comparison. *Limnol. Oceanogr.*, 40: 649-657.
- Albersheim, P., Nevins, D. J., English, P. D. y Karr, A. 1967. A method for the analysis of sugars in plant cell wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydr. Res.*, 5: 340-345.
- Allard, B. y Tazi, A. 1993. Influence of growth status on composition of extracellular polysaccharides from two *Chlamydomonas* species. *Phytochemistry*, 32 (1): 41-47.
- Allen, M. B. 1971. *Chlorella* mutants. *Meth. Enzymol.* XXIII Photosynthesis Part A: 168-171.
- Allen-Gil, S. M., Gubala, C. P., Wilson, R., Landers, D. H., Wade, T. L., Sericano, J. L. y Curtis, L. R. 1997. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls (PCBs) in sediments and biota from four U.S. Artic lakes. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 33 (4): 378-387.
- American Society for Testing and Materials. 1992. Standard guide for conducting static 96-h toxicity tests with microalgae. *Annual Book of ASTM Standards. E 1218-90*, 11/14: 874-885.
- Anónimo. 1976. Panorama hidrotermal argentino. *I.N.C.Y.T.H. Ministerio de Economía de la Nación, Subsecretaría de Recursos Hídricos*.
- Apt, K. E. y Behrens, P. W. 1999. Commercial developments in microalgal biotechnology. *J. Phycol.*, 35: 215-226.
- Archibald, P. A. y Bold, H. C. 1970. Phycological studies. XI. The Genus *Chlorococcum* Meneghini. *Univ. Texas Public.*, N° 7015, Austin, Texas, 86 pp.
- Atkinson Jr, A. W., Gunning, B. E. S. y John, P. C. L. 1972. Sporopollenin in the cell wall of *Chlorella* and other algae: ultrastructure, chemistry and incorporation of ^{14}C -acetate, studied in synchronous cultures. *Planta (Berl.)*, 107: 1-32.
- Avron, M. y Ben-Amotz, A. 1992. *Dunaliella*: Physiology, Biochemistry and Biotechnology. *CRC Press, Boca Raton, Florida.*, 240 pp.
- Babu, T. S., Huang, X-D y Greenberg, B. M. 2002. Reactive oxygen species mediated toxicity of environmental contaminants. *SETAC Globe*, 3 (3): 27-28.
- Bagchi, D., Bagchi, M., Hassoun, E. A. y Stohs, S. J. 1995. In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicology*, 104: 129-140.
- Baos, R., García-Villada, L., Agrelo, M., López-Rodas, V., Horaldo, F. y Costas, E. 2002. Short-term adaptation of microalgae in highly stressful environments: an experimental model analysing the resistance of *Scenedesmus intermedius* (Chlorophyceae) to the heavy metals mixture from the Aznalcollar mine spill. *Eur. J. Phycol.*, 37: 593-600.
- Beale, S. I. 1971. Studies on the biosynthesis and metabolism of δ -aminolevulinic acid in *Chlorella*. *Plant Physiol.*, 48: 316-319.
- Beale, S. I. 1978. δ -aminolevulinic acid in plants: its biosynthesis, regulation, and role in plastid development. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 29: 95-120.
- Beale, S. I. y Castelfranco 1973. ^{14}C incorporation from exogenous compounds into δ -aminolevulinic acid by greening cucumber cotyledons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 52 (1): 143-149.
- Beale, S. I., Foley, T. y Dzelzbalns, V. 1981. δ -aminolevulinic acid synthase from *Euglena gracilis*. *Proc. Natl. Acad.*

- Sci. USA.*, **78** (3): 1666-1669.
- Becker, M. J. y Shefner, A. M. 1964. Thin-layer and paper chromatographic analyses of the carbohydrates in the cell wall of *Chlorella pyrenoidosa* 7-11-05. *Nature.*, **20**: 803-804.
- Behrens, P. W. y Kyle, D. J. 1996. Microalgae as a source of fatty acids. *J. Food Lipids.*, **3**: 259-272.
- Beijerinck, M. W. 1890. Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen. *Z. Bot.*, **48**: 725-759.
- Bérard, A. y Pelte, T. 1999. Les herbicides inhibiteurs du photosystème II (PS II), effets sur les communautés algales et leur dynamique. Synthèse bibliographique. *Revue des Sciences de l'Eau.*, **12** (2): 333-361.
- Berman, F. W., Gerwick, W. H. y Murray, T. F. 1999. Antillatoxin and kalkitoxin, ichthyotoxins from the tropical cyanobacterium *Lyngbia majuscula*, induce distinct temporal patterns of NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *Toxicon*, **37**: 1645-1648.
- Billi de Catabbi, S. C. y San Martín de Viale, L. C. 1994. Studies on the active centre(s) of rat liver porphyrinogen carboxy-lyase. In vivo effect of hexachlorobenzene on decarboxylation site(s) of porphyrinogens. *Int. J. Biochem.*, **26** (4): 595-600.
- Billi de Catabbi, S., Rios de Molina, M. C. y San Martín de Viale, M. C. 1991. Studies on the active center of rat liver porphyrinogen carboxy-lyase in vivo effect of hexachlorobenzene. *Int. J. Biochem.*, **23**: 675-679.
- Billi de Catabbi, S., Sterin-Speziale, N., Fernandez, M. C., Minutolo, C., Aldonatti, C. y San Martín de Viale, L. 1997. Time course of hexachlorobenzene-induced alternations of lipid metabolism and their relation to porphyria. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **29** (2): 335-344.
- Bischoff, H. W. y Bold, H. C. 1963. Phycological Studies. IV. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. *Univ. Texas Public.* N°6318, Austin, Texas, 95 pp.
- Blaise, C. y Ménard, L. 1998. A micro-algal solid phase test to assess the toxic potential of freshwater sediments. *Water Qual Res J Can.*, **33**: 133-151.
- Bligh, E. G. y Dyer, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**: 911-917.
- Bogorad, L. 1958. The enzymatic synthesis of porphyrins from porphobilinogen. III. Uroporphyrinogens as intermediates. *J. Biol. Chem.*, **233** (1): 516-519.
- Booth, B. 1995. Estimación de la biomasa del plancton autotrófico usando microscopía. En: Alveal, K., Ferrario, M. E., Oliveira, S. y Sar, E. (eds.). *Manual de métodos ficológicos*. Universidad de Concepción, Chile: 187-198.
- Borowitzka, M. A. y Borowitzka, L. J. 1988. Micro-algal biotechnology. *Cambridge University Press*, 476 pp.
- Borowitzka, M. A. 1995. Microalga as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *J. Appl. Phycol.*, **7**: 3-15.
- Botham, P. A. 1990. Are pesticides immunotoxic? *Adverse Drug React Acute Poisoning Rev.*, **9**: 91-101.
- Boyd, M. R., Gustafson, K. R., Mc Mahon, J. B., Shoemaker, R. H., O' Keefe, B. R., Mori, T., Gulakowski, R. J., Wu, L., Rivera, M. I., Laurencot, C. M., Currens, M. J., Cardellina II J. H., Buckheit Jr., R. W., Nara, P. L., Pannell, L. K., Sowder II, R. C. y Henderson, L. E. 1997. Discovery of cyanovirin-N, a novel binds viral surface envelope glycoprotein gp120: potential applications to microbicide development. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **41**: 1521-1530.
- Brack, W. y Frank, H. 1998. Chlorophyll a fluorescence: A tool for the investigation of toxic effects in the photosynthetic apparatus. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **40**: 34-41.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**: 248-254.
- Breivik, K., Sweetman, A., Pacyna, J. M. y Jones, K. C. 2002. Towards a global historical emission inventory for selected PCB congeners-a mass approach. 1. Global production and consumption. *Sci. Total Environ.*, **290** (1): 181-198.
- Breu, V. y Dörnemann, D. 1988. Formation of δ -aminolevulinate via glutamate-semialdehyde and 4,5-dioxovalerate with participation of an RNA component in *Scenedesmus obliquus* mutant C-2A'. *Biochim. Biophys. Acta.*, **967** (2): 35-40.
- Brillouet, J. M., Rouau, X., Holzbler, C., Bary, J. L., Carré, B. y Lorta, E. 1988. A new method for determination of insoluble cell walls and soluble nonstarchy polysaccharides from plant materials. *J. Agric. Food. Chem.*, **36**: 969-979.
- Bro-Rasmussen, F., Calow, P., Canton, J. H., Chambers, P. L., Silva Fernandes, A., Hoffmann, L., Jouany, J. M., Klein, W., Persoone, G., Scoullou, M., Tarazona, J. V. y Vighi, M. 1994. EEC water quality objectives for chemicals dangerous to aquatic environment (List 1). *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, **137**: 83-110.
- Brown, M. R. y Farmer, C. L. 1994. Riboflavin content of six species of microalgae in mariculture. *J. Appl. Phycol.*, **6**: 61-65.
- Brundrett, M. C., Enstone, D. E. y Peterson, C. A. 1988. A berberine-aniline blue fluorescent staining procedure for suberin, lignin, and calose in plant tissue. *Protoplasma* **146**: 133-142.
- Burczyk, J., Termiska-Pabis, K. y Smietana, B. 1995. Cell wall neutral sugar composition of chlorococcalean algae forming and not forming acetolysis resistant biopolymer. *Phytochemistry.*, **38** (4): 837-841.

- Burja, A. M., Tamagnini, P., Bustard, M. T. y Wright, P. C. 2001. Identification of the green alga, *Chlorella vulgaris* (SDC1) using cyanobacteria derived 16S rDNA primers: targeting the chloroplast. *FEMS Microbiol. Lett.* **202**: 195-203.
- Burkiewicz, K. y Synak, R. 1996. Biological activity of the media after algal cultures can result from extracellular carbohydrates. *J. Plant Physiol.*, **148** (6): 662-666.
- Cánepa, E. T., Llambías, E. B. C. y Grinstein, M. 1984. Effect of glucose on the induction of δ -aminolevulinic acid synthase and ferrochelatase in isolated hepatocytes by allylisopropylacetamide. *Biochim. Biophys. Acta*, **804**: 8-15.
- Cannell, R. J. P. 1993. Algae as a source of biologically active products. *Pestic. Sci.*, **39**: 147-153.
- Cannell, R. J. P., Owssianka, A. M. y Walker, J. M. 1988. Results of a large-scale screening programme to detect antibacterial activity from freshwater algae. *Br. Phycol. J.*, **23** : 41-44.
- Cantoni, L., Dal Fiume, D., Rizzardini, M. y Ruggieri, R. 1984. *In vitro* inhibitory effect on porphyrinogen carboxylase of liver extract from TCDD treated mice. *Toxicol. Lett.*, **20**: 211-217.
- Carell, E. F. y Kahn, J. S. 1964. Synthesis of porphyrins by isolated chloroplasts of *Euglena*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **108**: 1-6.
- Castelfranco, P. A. y Beale, S. I. 1983. Chlorophyll Biosynthesis: Recent Advances and Areas of Current Interest. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **34**: 241-278.
- Caux, P.-Y., Ménard, L. y Kent, R. A. 1996. Comparative study of the effects of MCPA, butylate, atrazine, and cyanazine on *Selenastrum capricornutum*. *Environ. Poll.*, **92** (2): 219-225.
- Chapman, J. C. 1995. The role of ecotoxicity testing in assessing water quality. *Aust. J. Ecol.*, **20**: 20-27.
- Chaufan, G., Ríos de Molina, M. C. y San Martín de Viale, L. C. 2001. How does hexachlorobenzene treatment affect liver uroporphyrinogen decarboxylase? *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **33**: 621-630.
- Chem, T. C. y Miller, G. W. 1974. Purification and characterization of uroporphyrinogen decarboxylase from tobacco leaves. *Plant Cell Physiol.*, **15**: 993-1005.
- Chen, M. W., Jahn, D., O' Neil, G. P. y Söll, D. 1990. Purification of the glutamyl-tRNA reductase from *Chlamydomonas reinhardtii* involved in δ -aminolevulinic acid formation during chlorophyll biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, **265** (7): 4058-4063.
- Chen, T. C. y Miller, G. W. 1974. Purification and characterization of uroporphyrinogen decarboxylase from tobacco leaves. *Plant Cell Physiol.* **15**: 993-1005.
- Cobbett, C. S. 2000. Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Curr. Op. Plant Biol.* **3**: 211-216.
- Cohen, Z., Norman, H. A. y Heimer, Y. M. 1995. Microalgae as a source of omega-3 fatty acids. *World Rev. Nutr. Diet.*, **77**: 1-31.
- Collins, C. H., Lynes, P. M. y Grange, J. M. 1989. Antimicrobial sensitivity and assay tests. En: Collins, C.H. y Lynes, P.M. (eds.): *Microbial methods*, Butterworth, London.: 155-168.
- Corvi, M., Chaufan, G., Armesto, A., San Martín de Viale, L. C., Luquet, C. y Rios de Molina, M. C. 1999. Uroporphyrinogen decarboxylase. Comparative studies between the enzyme coming from rat liver and crab hepatopancreas. *Comp. Biochem Physiol.*, **124A** (Suppl.S): 94.
- Costner, P. 2000. Dioxin elimination: A global imperative. *Greenpeace International* ISBN 90-73361: 55-59.
- Costner, P., Cray, C., Martin, G., Rice, B., Santillo, D. y Stringer, R. 1995. PVC: A primary contributor to the U.S. dioxin burden. *Washington, D.C.: Greenpeace, february 1995*.
- Cox, C. 1998. Herbicide factsheet. Picloram. *J. Pest. Reform*, **18** (1): 13-20.
- Cozzolino, S., Campo, I., Moretti, M. A. y Pollio, A. 1999. The use of nuclear ribosomal ITS1 DNA sequences for the identification of *Chlorella* strains. *Algological Studies.*, **95**: 31-42.
- Cullimore, D.R. 1969. The Adansonian classification using the heterotrophic spectra of *Chlorella vulgaris* by a simplified procedure involving a desk-top computer. *J. Appl. Bacteriol.*, **32**: 439-447.
- Da Silva, E. J. y Gyllenberg, H. G. 1972. A taxonomic treatment of the genus *Chlorella* by the technique of continuous classification. *Arch. Mikrobiol.*, **87**: 99-117.
- Dailey, H. A. 1997. Enzymes of heme biosynthesis. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2**: 411-417.
- D'Ambrogio de Argüeso, A. 1986. Manual de técnicas de histología vegetal. *Hemisferio Sur, Buenos Aires*, 83 pp.
- Daniel, W. W. 1978. Nonparametric statistics. Houghton Mifflin Co., Boston.
- Dantas, D. C. M., Kaneno, R. y Queiroz, M. L. S. 1999. The effects of *Chlorella vulgaris* in the protection of mice infected with *Listeria monocytogenes*. Role of natural killer cells. *Immunopharmacology and Immunotoxicology.*, **21** (3): 609-619.
- Davies, J. S. 1990. Neurotoxic concerns of human pesticide exposure. *Am. J. Ind. Med.*, **18**: 327-331.
- Davis, A. P., Shokouhian, M. y Ni, S. B. 2001. Loading estimates of lead, copper, cadmium, and zinc in urban runoff from specific sources. *Chemosphere.*, **44**: 997-1009.
- de Caire, G. Z., de Cano, M. S., de Mulé, M. C. Z. y de Halperín, D. R. 1993. Screening of cyanobacterial bioactive compounds against human pathogens. *Phyton*, **54** (1): 59-65.
- de Mulé, M. C. Z., de Caire, G. Z. y de Cano, M. S. 1996. Bioactive substances from *Spirulina platensis* (Cyanobacteria). *Phyton*, **58** (1/2): 93-96.

- de Verneuil, H., Sassa, S. y Kppas, A. 1983a. Effects of polychlorinated biphenyl compounds 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, phenobarbital and iron on hepatic uroporphyrinogen decarboxylase. *Biochem. J.* **214**: 145-151.
- de Verneuil, H., Sassa, S. y Kappas, A. 1983b. Purification and properties of uroporphyrinogen decarboxylase from human erythrocytes. A single enzyme catalysing the four sequential decarboxylations of uroporphyrinogens I and III. *J. Biol. Chem.*, **258**: 2454-2460.
- Domozych, C. R., Plante, K., Blais, P., Pauliulis, L. y Domozych, D. S. 1993. Mucilage processing and secretion in the green alga *Closterium*. I. Cytology and biochemistry. *J. Phycol.*, **29**: 650-659.
- Dörnemann, D., Breu, V., Kotzabasis, K., Richter, P. y Senger, H. 1990. Intermediates catalytic components and light and dark regulation of ALA and chlorophyll formation in the green alga *Scenedesmus*. *Curr. Res. Photosynth.*, **4**: 287-290.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. y Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.*, **28**: 350-356.
- El Jay, A. 1996. Effects of organic solvents and solvent-atrazine interactions on two algae, *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **31**: 84-90.
- Elder, G. H. 1998. Porphyrin cutanea tarda. *Sem. liver dis.*, **18** (1): 67-75.
- Elder, G. H., Tovey, J. A. y Sheppard, D. M. 1983. Purification of uroporphyrinogen decarboxylase from human erythrocytes. Immunochemical evidence from a single protein with decarboxylating activity in human erythrocytes and liver. *Biochem. J.* **215**: 45-55.
- EL-Naggar, A. y EL-Sheekh, M. 1998. Abolishing cadmium toxicity in *Chlorella vulgaris* by ascorbic acid, calcium, glucose and reduced glutathione. *Environ. Pollution.*, **101**: 169-174.
- El-Sheekh, M. M., Kotkat, H. M. y Hammouda, O. H. E. 1994. Effect of atrazine herbicide on growth, photosynthesis, protein synthesis, and fatty acid composition in the unicellular green alga *Chlorella kessleri*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **29**: 349-358.
- Environment Canada. 1992. Biological test method: Growth inhibition tests using the freshwater alga *Selenastrum capricornutum*. Report EPS 1/RM/25. Environment Canada, Ottawa, ON.
- Fabregas, J., García, D., Fernandez-Alonso, M., Rocha, A. I., Gómez-Puertas, A., Escribano, J. M., Otero, A. y Coll, J. M. 1999. In vitro inhibition of the replication of haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) and African swine fever virus (ASFV) by extracts from marine microalgae. *Antivir. Res.*, **44**: 67-73.
- Farrel, R. E., Germida, J. J. y Hunag, P. M. 1990. Biototoxicity of mercury as influenced by mercury (II) speciation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**: 3006-3016.
- Felix, F. y Brouillet, N. 1990. Purification and properties of uroporphyrinogen decarboxylase from *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast uroporphyrinogen decarboxylase. *Eur. J. Biochem.*, **188**: 393-403.
- Feroli, A., Harvey, C. y De Matteis, F. 1984. Drug-induced accumulation of uroporphyrin in chicken hepatocyte cultures. *Biochem. J.*, **224**: 769-777.
- Fogg, G. E. 1971. Extracellular products of algae in fresh water. *Arch. Hydrobiol.*, **5**: 1-25.
- Foley, T. y Beale, S. I. 1982. δ -Aminolevulinic acid formation from γ , δ -dioxovaleric acid in extracts of *Euglena Gracilis*. *Plant Physiol.*, **70**: 1495-1502.
- Fott, B. y Nováková 1969. A monograph of the genus *Chlorella*. The fresh water species. En: Fott, B. (ed.). *Studies in Phycology*, Academia, Prague: 10-74.
- Fox, T. C. y Guerinot, M. L. 1998. Molecular biology of cation transport in plants. *An. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **49**: 669-696.
- Francis, J. E. y Smith, A. G. 1988. Oxidation of uroporphyrinogens by hydroxyl radicals. Evidence for nonporphyrin products as potential inhibitors of uroporphyrinogen decarboxylase. *FEBS Lett.*, **233**: 311-314.
- Franken, M. y Franken, W. 1977. Limnologische Untersuchungen am grossen Bullensee, einen sauren Heidesee Norddeutschlands I. Chemie, Hydrologie, Phytoplankton. *Arch. Hydrobiol.* **5**: 563-576.
- Franklin, N. M., Stauber, J. L., Apte, S. C. y Lim, R. P. 2002. Effect of initial cell density on the bioavailability and toxicity of copper in microalgal bioassays. *Environ. Toxicol. Chem.*, **21** (4): 742-751.
- Franklin, N. M., Stauber, J. L., Markich, S. J. y Lim, R. 1998. A new tropical algal test to assess the toxicity of metals in freshwaters. *Supervising Scientist Report 133*, Supervising Scientist Canberra..
- Franklin, N. M., Stauber, J. L., Markich, S. J. y Lim, R. P. 2000. pH-dependent toxicity of copper and uranium to a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.). *Aquatic Toxicol.*, **48**: 275-289.
- Friedl, T. 1995. Inferring taxonomic positions and testing genus level assignments in coccoid green lichen algae: a phylogenetic analysis of 18S ribosomal RNA sequences from *Dictyochloropsis reticulata* and from members of the genus *Myrmecia* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae Cl. nov.). *J. Phycol.*, **31**: 632-639.
- Friedl, T. 1997. The evolution of the green algae. En: Bhattacharya, D. (ed.). *Origin of algae and their plastids*. Springer, Wien: 87-101.
- Gahan, P. B. 1984. Plant histochemistry and cytochemistry. An introduction. Academic Press, New York..
- García, R. C., San Martín de Viale, L. C., Tomio, J. M. y Grinstein, M. 1973. Porphyrin biosynthesis. X. Porphyrinogen carboxy-lyase from avian erythrocytes. Further properties. *Biochim. Biophys. Acta.*, **309**: 203-210.
- Garey, J. R., Labbe-Bois, R., Cheltowska, A., Rytka, J., Harrison, L., Kushner, J. y Labbe, P. 1992. Uroporphyrinogen

- decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae*. HEM 12 gene sequence and evidence for two conserved glycines essential for enzyme activity. *Eur. J. Biochem.*, **205**: 1011-1016.
- Gassman, M., Plusec, J. y Bogorad, L. 1968. δ - aminolevulinic acid transaminase in *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiol.*, **43**: 1411-1414.
- Geis, S. W., Fleming, K. L., Korthals, E. T., Searle, G., Reynolds, L. y Karner, D. A. 2000. Modification to the algal growth inhibition test for use as a regulatory assay. *Environ. Toxicol. Chem.*, **19** (1): 36-41.
- George, E. A. 1958. Culture collection of algae and protozoa. *Univ. Cambridge*, 33 pp.
- George, E. A. 1966. The culture collection of algae and protozoa. *List of strains Bot. School, Cambridge*, 67 pp.
- Giordano, M., Davis, J. S. y Bowes, G. 1994. Organic carbon release by *Dunaliella salina* (Chlorophyta) under different growth conditions of CO₂, nitrogen and salinity. *J. Phycol.*, **30**: 249-257.
- Gledhill, M., Nimmo, M., Hill, S. J. y Brown, M. T. 1997. The toxicity of copper (II) species to marine algae, with particular reference to macroalgae. *J. Phycol.*, **33** (1): 2-11.
- Gledhill, M., Nimmo, M., Hill, S. J. y Brown, M. T. 1999. The release of copper-complexing ligands by the brown alga *Fucus vesiculosus* (Phaeophyceae) in response to increasing total copper levels. *J. Phycol.*, **35** (3): 501-509.
- Gómez-Catalán, J., Planas, J., To-Figueras, J., Camps, M. y Corbella, J. 1993. Organochlorine pesticide residues in the population of Catalonia (Spain). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **51**: 160-164.
- Gómez-Silva, B., Timko, M. P. y Schiff, J. A. 1985. Chlorophyll biosynthesis from glutamate or 5-aminolevulinate in intact *Euglena* chloroplasts. *Planta*, **165**: 12-22.
- Gonzales, A., Steffen, K. L. y Lynch, J. P. 1998. Light and excess manganese. Implications for oxidative stress in common bean. *Plant Physiol.*, **118**: 493-504.
- González Dávila, M., Santana-Casiano, J. M., Pérez-Peña, J. y Millero, F. J. 1995. Binding of Cu (II) to the surface and exudates of the alga *Dunaliella tertiolecta* in seawater. *Environ. Sci. Technol.*, **29**: 289-301.
- Gove, L., Nicholson, F. A. y Beck, A. J. 2001. Movement of water and heavy metals (Zn, Cu, Pb and Ni) through sand and sandy loam amended with biosolids under steady-state hydrological conditions. *Biosour. Technol.*, **78**: 171-179.
- Granick, S. 1948. Protoporphyrin 9 as a precursor of chlorophyll. *J. Biol. Chem.*, **172**: 717-727.
- Granick, S. 1971. Preparation and properties of *Chlorella mutants* in chlorophyll biosynthesis. *Meth. Enzymol. XXIII Photosynthesis Part A*: 162-168.
- Granick, S. y Beale, S. I. 1978. Hemes, chlorophylls, and related compounds: biosynthesis and metabolic regulation. *Adv. Enzymol. Rel. Areas Mol. Biol.*, **46**: 33-203.
- Gray, J. S. 2002. Biomagnification in marine systems: the perspective of an ecologist. *Mar. Pollut. Bull.* **45**: 46-52.
- Grimm, B. 1998. Novel insights in the control of tetrapyrrole metabolism of higher plants. *Curr. Op. Plant Biol.*, **1**: 245-250.
- Guanzon, N. G. Jr., Nakahara, H. y Yoshida, Y. 1994. Inhibitory effects of heavy metals on growth and photosynthesis of three freshwater microalgae. *Fish. Sci.*, **60**: 379-384.
- Hanagata, N. y Dubinsky, Z. 1999. Secondary carotenoid accumulation in *Scenedesmus komarekii* (Chlorophyceae, Chlorophyta). *J. Phycol.*, **35**: 960-966.
- Hanagata, N., Karube, I., Chihara, M. y Silva, P.C. 1998. Reconsideration of the taxonomy of the ellipsoidal species of *Chlorella* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), with the establishment of *Watanabea* gen. nov. *Phycol. Res.*, **46**: 224-230.
- Hansson, M. y Hederstedt, L. 1992. Cloning and characterization of the *Bacillus subtilis* hemEHY gene cluster, which encodes protoheme IX biosynthetic enzymes. *J. Bact.*, **174**: 8081-8093.
- Hasegawa, T., Ito, K., Ueno, S., Kumamoto, S., Ando, Y., Yamada, A., Nomoto, K. y Yoshikai, Y. 1999. Oral administration of hot water extracts of *Chlorella vulgaris* reduces IgE production against milk casein in mice. *Int. J. Immunopharmacol.*, **21**: 311-323.
- Hasegawa, T., Kimura, Y., Hiromatsu, K., Kobayashi, N., Yamada, A., Makino, M., Okuda, M., Sano, T., Nomoto, K. y Yoshikai, Y. 1997. Effect of hot water extract of *Chlorella vulgaris* on cytokine expression patterns in mice with murine acquired immunodeficiency syndrome after infection with *Listeria monocytogenes*. *Immunopharmacol.*, **35**: 273-282.
- Hayashi, K., Hamada, J. y Hayashi, T. 1996. A screening strategy for selection of anti-HSV-1 and anti-HIV extracts from algae. *Phytother. Res.*, **10**: 233-237.
- Hegewald, E. y Schnepf, E. 1991. *Scenedesmus abundans* (Kirchn.) Chod., an older name for *Chlorella fusca* Shih. et Kraus. *Arch. Protistenkd.*, **139**: 133-176.
- Hellebust, J. A. 1974. Extracellular products. En: Stewart, W.D. (ed.). *Algal physiology and biochemistry*. Blackwell Sci. Publ. Oxford, London: 838-863.
- Hellmann, V. y Kessler, E. 1974. Physiologische und biochemische Beiträge zur Taxonomie der Gattung *Chlorella* VIII. Die Basenzusammensetzung der DNS. *Arch. Microbiol.*, **100**: 239-242.
- Horner, D. S., Heil, B., Happe, T. y Embley, T. M. 2002. Iron hydrogenases-ancient enzymes in modern eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.*, **27** (3): 148-153.
- Hu, G., Yalpani, N., Briggs, S. P. y Johal, G. S. 1998. A porphyrin pathway impairment is responsible for the phenotype

- of a dominant disease lesion mimic mutant of maize. *Plant Cell*, **10**: 1095-1105.
- Huss, V. A. R. y Huss, G. Kessler E. 1989. Deoxyribonucleic acid reassociation and interspecies relationships of the genus *Chlorella* (Chlorophyceae). *Pl. Syst. Evol.*, **168**: 71-82.
- Huss, V. A. R. y Sogin, M. L. 1990. Phylogenetic position of some *Chlorella* species within the Chlorococcales based upon complete small-subunit ribosomal RNA sequences. *J. Mol. Evol.*, **31**: 432-442.
- Huss, V. A. R., Ciniglia, C., Cennamo, P., Cozzolino, S., Pinto, G. y Pollio, A. 2002. Phylogenetic relationships and taxonomic position of *Chlorella*-like isolates from low pH environments (pH<3,0). *BMC Evolut. Biol.*, **2002**: 1-9.
- Huss, V. A. R., Frank, C. F., Hartmann, E. C., Hirmer, M., Kloboucek, A., Seidel, B. M., Wenzeler P. y Kessler, E. 1999. Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella sensu lato* (Chlorophyta). *J. Phycol.*, **35**: 587-598.
- Ikeda, T. y Takeda. 1995. Species-specific differences of pyrenoids in *Chlorella* (Chlorophyta). *J. Phycol.*, **31**: 813-818.
- Jackson, A. H., Sankovich, H. A., Ferramola, A. M., Evans, N., Games, D. E., Matlin, S. A., Elder, G. H. y Smith, S. G. 1976. Macrocyclic intermediates in the biosynthesis of porphyrins. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B*, **273**: 191-206.
- Jacobs, J. M. y Jacobs, N. J. 1993. Porphyrin accumulation and export by isolated barley (*Hordeum vulgare*) plastids. *Plant Physiol.*, **101**: 1181-1187.
- Jenkins, S., Addy, M. y Newcombe, R. J. 1993. A dose-response study of triclosan mouthrinses on plaque regrowth. *J. Clin. Periodontol.*, **20** (8): 609-612.
- Jeong, J., Urban, N. R. y Green, S. 1999. Release of copper from mine tailings on the Keweenaw Peninsula. *J. Great Lakes Res.*, **25**: 721-734.
- Joliot, P. y Joliot, A. 1998. In vivo analysis of the effect of dicyclohexylcarbodiimide on electron and proton transfers in cytochrome *bf* complex of *Chlorella sorokiniana*. *Biochemistry*, **37**: 10404-10410.
- Jones, R. M. y Jordan, P. M. 1993. Purification and properties of the uroporphyrinogen decarboxylase from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochem. J.*, **293**: 703-712.
- Jorgensen, E. G. 1962. Antibiotic substances from unicellular algae. *Physiol. Plant.*, **15**: 530-545.
- Juárez, A. B. y Accorinti, J. 1995. Actividad antimicrobiana de compuestos extracelulares producidos por cultivos axénicos de *Chlorella kessleri* (Chlorococcales, Chlorophyceae). *Bol. Soc. Argent. Bot.*, **31** (1-2): 13-18.
- Juárez, A. B. y Velez, C. G. 1993. Sobre la presencia de *Chlorella kessleri* (Chlorococcales, Chlorophyceae) en aguas del Complejo Termal Copahue (prov. de Neuquén, Argentina). *Bol. Soc. Argent. Bot.*, **29** (1-2): 105-107.
- Juknat, A. A. Seubert A. Seubert S. y Ippen, H. 1989. Studies on uroporphyrinogen decarboxylase of etiolated *Euglena gracilis* Z. *Eur. J. Biochem.*, **179**: 423-428.
- Kalina, T. y Punčochárova, M. 1987. Taxonomy of the subfamily Scotielloccystoideae Fott 1976 (Chlorellaceae, Chlorophyceae). *Algol. Stud.*, **45**: 473-521.
- Kannangara, C. G., Gough, S. P., Bruyant, P., Hooper, J. K., Kahn, A. y von Wettstein, D. 1988. tRNA Glu as a cofactor in δ -aminolevulinic acid biosynthesis: steps that regulated chlorophyll synthesis. *TIBS*, **13**: 139-143.
- Kaplan, D. 1987. Chelating properties of extracellular polysaccharides from *Chlorella* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **12**: 2953-2956.
- Kasai, F. y Hatakeyama, S. 1993. Herbicide susceptibility in green algae *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum*. *Chemosphere.*, **27**: 899-904.
- Kates, M. 1988. Techniques of lipidology. Isolation, analysis and identification of lipids. En: Burdon, R.H. y van Knippenberg, P.H. (eds.). *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology.*, **3**, part 2, 400 pp.
- Kawanishi, S., Seki, Y. y Sano, S. 1983. Uroporphyrinogen decarboxylase. Purification, properties, and inhibition by polychlorinated biphenyl isomers. *J. Biol. Chem.*, **258**: 4285-4292.
- Kerfin, W. y Kessler, E. 1978. Physiological and biochemical contributions to the taxonomy of the genus *Chlorella*. XI. DNA hybridization. *Arch. Microbiol.*, **116**: 97-103.
- Kessler, E. 1974. Hydrogenase, photoreduction and anaerobic growth. En: Stewart, W.D.P. (ed.). *Algal Physiology and Biochemistry*. Blackwell, Oxford.: 456-473.
- Kessler, E. 1976. Comparative physiology, biochemistry and the taxonomy of *Chlorella* (Chlorophyceae). *Plant Syst. Evol.* **125**: 129-138.
- Kessler, E. 1978. Physiological und biochemical contributions to the taxonomy of the genus *Chlorella*. XII. Starch hydrolysis and a key for the identification of 13 species. *Arch Microbiol.*, **119**: 13-16.
- Kessler, E. 1982. Chemotaxonomy in the Chlorococcales. En: Round, F.E. y Chapman, D.J. (eds.). *Progress in Phycological Research 1*. Elsevier, Amsterdam: 111-135.
- Kessler, E. 1984. A general review on the contribution of chemotaxonomy to the systematics of green algae. En: Irvine, D. E. G. y John, D. M. (eds.). *Systematics of the green algae*. Academic Press, London: 391-407.
- Kessler, E. 1985a. An extremely cadmium-sensitive strain of *Chlorella*. *Experientia.*, **41**: 1621.
- Kessler, E. 1985b. Upper limits of temperature for growth in *Chlorella* (Chlorophyceae). *Pl. Syst. Evol.*, **151**: 67-71.
- Kessler, E. 1986. Limits of growth of five *Chlorella* species in the presence of toxic heavy metals. *Algol. Stud.* **42**: 123-128.
- Kessler, E. 1987. Separation of *Chlorella ellipsoidea* from *C. saccharophila* (Chlorophyceae): no growth on mannitol

- and cadmium sensitivity. *Plant Syst. Evol.*, **157**: 247-251.
- Kessler, E. 1992. *Chlorella* – biochemische Taxonomie einer für Forschung und Biotechnologie wichtigen Gattung einzelliger Grünalgen. *Naturwissenschaften*, **79**: 260-265.
- Kessler, E. y Czygan, F. C. 1965. *Chlorella zofingiensis* Dönn: Isolierung neuer Stämme und ihre physiologisch-biochemischen Eigenschaften. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, **78**: 342-347.
- Kessler, E. y Huss, V. A. R. 1992. Comparative physiology and biochemistry and taxonomic assignment of the *Chlorella* (Chlorophyceae) strains of the Culture Collection of the University of Texas at Austin. *J. Phycol.*, **28**: 550-553.
- Kessler, E. y Maifarth. 1960. Vorkommen und Leistungsfähigkeit von Hydrogenase bei einigen Grünalgen. *Arch. Mikrobiol.*, **37**: 215-225.
- Kessler, E. y Soeder. 1962. Biochemical contributions to the taxonomy of the genus *Chlorella*. *Nature (London)*, **194**: 1096-1097.
- Kessler, E. y Zweier. 1971. Physiologische und biochemische Beiträge zur Taxonomie der Gattung *Chlorella*. V. Die auxotrophen und mesotrophen Arten. *Arch. Mikrobiol.*, **79**: 44-48.
- Kessler, E., Langner, W., Luderwig, I. y Wiechmann, H. 1963. Bildung von Sebundär-carotenoiden bei Stickstoffmangel und hydrogenase-Aktivität als taxonomische Merkmale in der Gattung *Chlorella*. *Studies Microal. Photosynth. Bact.*, 7-20.
- Kessler, E., Schäfer, M., Hümmer, C., Kloboucek, A. y Huss, V. A. R. 1997. Physiological, biochemical and molecular characters for the taxonomy of the subgenera of *Scenedesmus* (Chlorococcales, Chlorophyta). *Botanica Acta*, **110**: 244-250.
- Khalil, Z. 1996. Response of *Phormidium fragile* to cadmium and the interactive effects of calcium and ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA). *Egyptian J. Microbiol.*, **31**: 461-472.
- Khangarot, B. S. y Rathore, R. S. 2003. Effects of copper on respiration, reproduction, and some biochemical parameters of water flea *Daphnia magna* Straus. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **70**: 112-117.
- Kiefer, E. Sigg, L. y Schasseler, P. 1997. Chemical and spectroscopic characterization of algae surfaces. *Environ. Sci. Technol.*, **31** (3): 759-764.
- Kiel, J. A. K., Boels, J. M., Beldman, G. y Venema, G. 1990. Nucleotide sequence of the *Synechococcus* sp. PCC7942 branching enzyme (glgB): expression in *Bacillus subtilis*. *Gene* **89**: 77-84.
- Klein, O., Dörnemann, D. y Senger, H. 1980. Two biosynthetic pathways to 5-aminolevulinic acid in algae. *Int. J. Biochem.*, **12**: 725-728.
- Knauer, K., Behra, R. y Sigg, L. 1997. Adsorption and uptake of copper by the green alga *Scenedesmus subspicatus* (Chlorophyta). *J. Phycol.*, **33**: 596-601.
- Koch, W. 1964. Verzeichnis der Sammlung von Algenkulturen und Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Göttingen. *Arch. Mikrobiol.*, **47**: 492-432.
- Koelmans, A. A., Sánchez Jimenez, C. y Lijklema, L. 1993. Sorption of chlorobenzenes to mineralizing phytoplankton. *Environ. Toxicol. Chem.*, **12**: 1425-1439.
- Komárek, J. y Fott, B. 1983. Chlorophyceae: Chlorococcales. En: Hubber-Pestalozzi, G. (ed.). *Das phytoplankton des süßwassers, die binnengewässer* 7. Schweizerbart'sche verlagsbuchhandlung, Stuttgart: 100-144.
- Kong, F. X., Hu, W. y Liu, Y. 1998. Molecular structure and biochemical toxicity of four halogeno-benzenes on the unicellular green alga *Selenastrum capricornutum*. *Environ. Exper. Bot.*, **40**: 105-111.
- Koopmann, G. E. y Batlle, A. M. C. 1987. Biosynthesis of porphyrins in *Rhodospseudomonas palustris*. IV. The effect of metals, thiols and other reagents on the activity of uroporphyrinogen decarboxylase. *Int. J. Biochem.*, **19** (4): 373-377.
- Koopmann, G. E., Yuknat, A. A. y Batlle, A. M. C. 1986. Porphyrin biosynthesis in *Rhodospseudomonas palustris*. V. Purification of porphyrinogen decarboxylase and some unusual properties. *Int. J. Biochem.*, **18** (10): 935-944.
- Koszo, F., Horvath, L. I., Simon, N., Siklosi, C. y Kiss, M. 1982. The role of possible membrane damage in porphyria cutanea tarda. A spin label study of rat liver cell membrane. *Biochem. Pharmacol.*, **31**: 11-17.
- Krishnamurthy, K. V. 1999. Methods in cell wall cytochemistry. *CRC Press. Boca Ratón, London, New York, Washington DC.*, 318 pp.
- Kümmel y Kessler, E. 1980. Physiological and biochemical contributions to the taxonomy of the genus *Chlorella*. XIII. Serological studies. *Arch. Mikrobiol.*, **126**: 15-19.
- Küpper, H., Setlik, I., Spiller, M., Küpper, F. C. Y Prášil, O. 2002. Heavy metal-induced inhibition of photosynthesis: Targets of in vivo heavy metal chlorophyll formation. *J. Phycol.* **38** (3): 429-441.
- Lage, O. M., Parente, A. M. y Salema, R. 1994a. Electrophoretic analysis of polypeptides of *Prorocentrum micans* Ehrenberg exposed to toxic levels of copper. *Rev. Palaeobot. Palynol.*, **84**: 107-112.
- Lage, O. M., Parente, A. M., Soares, H. M. V. M., Vasconcelos, M. T. C. D. y Salema, R. 1994b. Some effects of copper on the dinoflagellates *Amphidinium carterae* and *Prorocentrum micans* in batch culture. *Env. J. Phycol.*, **29**: 253-260.
- Laguna, M. R., Villar, R., Calleja J. M. y Cadavid, I. 1993. Effects of *Chlorella stigmatophora* extract on the central nervous system. *Planta Med.*, **59**: 125-130.

- Lam, P. K. S., Wut, P. F., Chan, A. C. y Wu, R. S. S. 1999. Individual and combined effects of cadmium and copper on the growth response of *Chlorella vulgaris*. *Inc. Environ. Toxicol.*, **14**: 347-353.
- Landner, L. y Lindestrom, L. 1999. Copper in society and the environment: An account of the facts on fluxes, amounts and effects of Copper in Sweden. *Swedish Environ. Res. Group (MFG)*, Stockholm, Sweden.
- Lane Smith, R. y Gilkerson, E. 1979. Quantitation of glycosaminoglycan hexosamine using 3-methyl-2-benzoniazolone hydrazone hydrochloride. *Anal. Biochem.*, **98**: 478-480.
- Lee, C. M. y Allen, H. E. 1998. The ecological risk assessment of copper differs from that of hydrophobic organic chemicals. *Hum. Ecol. Risk Assess.*, **4**: 605-617.
- Lee, Y. K. 1997. Commercial production of microalgae in the Asia-Pacific rim. *J. Appl. Phycol.*, **9**: 403-411.
- Leeper, F. J. 1985. The biosynthesis of porphyrins, chlorophylls, and vitamin B₁₂. *Nat. Prod. Rep.*, **2** (6): 561-580.
- Lei, A-P, Wong, Y-S y Tam, N. F-Y. 2003. Pyrene-induced changes of glutathione-S-transferase activities in different microalgal species. *Chemosphere.*, **50**: 293-301.
- Lichtenthaler, H. K. 1987. Chlorophylls and carotenoid: pigments of photosynthetic biomembranes. *Meth. Enzymol.*, **148**: 349-382.
- Lombardi, A. T. y Vieira, A. A. H. 2000. Copper complexation by Cyanophyta and Chlorophyta exudates. *Phycologia*, **39** (2): 118-125.
- Lombardo, M. E., Araujo, L. S., Juknat, A. A. y Batlle, A. M. C. 1988. Effect of illumination on growth, chlorophyll content and δ -aminolevulinic acid synthesis in *Euglena gracilis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **91B** (2): 279-284.
- Lombardo, M. E., Araujo, L. S., Juknat, A. A. y Batlle, A. M. C. 1989. Glutamate: 4,5- dioxovaleric acid transaminase from *Euglena gracilis*. Kinetic studies. *Eur. J. Biochem.*, **182**: 657-660.
- Loos, E. y Meindl, D. 1982. Composition of the cell wall of *Chlorella fusca*. *Planta*, **156**: 270-273.
- Luft, J. H. 1971. Ruthenium red and violet. I. Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action. *Anat. Rec.*, **171**: 347-368.
- Lulai, E. C. y Morgan, W. C. 1992. Histochemical probing of potato periderm with neutral red: a sensitive cytafluorochrome for the hidrophobic domain of suberin. *Biotechnic & Histochemistry.*, **67** (4): 185-195.
- Ma, M., Zhu, W., Wang, Z. y Witkamp, G. J. 2003. Accumulation, assimilation and growth inhibition of copper on freshwater alga (*Scenedesmus suspicatus* 86. 81 SAG) in the presence of EDTA and fulvic acid. *Aquat. Toxicol.*, **63**: 221-228.
- Mac Faddin, J. F. 1980. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. *Editorial Médica Panamericana.*, 301 pp.
- Macfie, S. M. y Welbourn, P. M. 2000. The cell wall as a barrier to uptake of metal ions in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **39**: 413-419.
- Maeda, H. y Hishida, N. 1967. Specificity of binding of hexapyranosil polysaccharides with fluorescent brightener. *J. Biochem.*, **62**: 276-278.
- Mangold, H. K. 1965. Aliphatic lipids. En: Stahl, E. (ed.). *Thin-layer chromatography. A laboratory handbook*, Springer-Verlag, Berlin: 137-186.
- Margaleff, R. 1983. Limnología. *Ed. Omega*, Barcelona, España, 1010 pp.
- Marker, A. F. H., Nusch, E. A., Rai, H. y Rienemann, B. 1980. The measurement of photosynthetic pigments in freshwater and standardization of methods: conclusions and recommendations. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.*, **14**: 91-106.
- Marsálek, B. y Rojicková, R. 1996. Stress factors enhancing production of algal exudates: a potential self-protective mechanism? *Z. Naturforsch.*, **51**: 646-650.
- Marschner, H. 1993. Mineral nutrition of higher plants. *Academic Press, 5ta. ed.*, Londres, R.U., 674 pp.
- Martins, B. M., Grimm, B., Mock, H. P., Huber, R. y Messerschmidt, A. 2001. Crystal structure and substrate binding modeling of the Uroporphyrinogen-III decarboxylase from *Nicotiana tabacum*. *J. Biol. Chem.*, **276** (47): 44108-44116.
- Maruyama, K. 1977. Classification of *Chlorella* strains by cell appearance and group sera. *Bot. Mag. Tokyo*, **90**: 57-66.
- Matusiak, K. Y Krzywicka, A. 1975. Influence of the extracts of *Chlorella vulgaris* on growth of fungi. *Acta Microbiol. Polon. Sec. B*, **7**: 51-54.
- Mauzerall, D. y Granick, S. 1956. The occurrence and determination of δ -aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. *J. Biol. Chem.*, **219**: 435-446.
- Mauzerall, D. y Granick, S. 1958. Porphyrin biosynthesis in erythrocytes. III. Uroporphyrinogen and its decarboxylase. *J. Biol. Chem.*, **232**: 1141-1162.
- Mayer, A. M. S. y Hamann, M. T. 2002. Marine pharmacology in 1999: compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, antihelminthic, antiinflammatory, antiplatelet, antiprotozoal and antiviral activities affecting the cardiovascular endocrine, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Comp. Biochem. Physiol. Part C.*, **132**: 315-339.
- Mayer, S. M. y Beale, S. I. 1992. Succinil-coenzyme A synthetase and its role in δ -aminolevulinic acid biosynthesis in *Euglena gracilis*. *Plant Physiol.*, **99**: 482-487.
- Mayer, S. M., Beale, S. I. y Weinstein, J. D. 1987. Enzymatic conversion of glutamate to δ -aminolevulinic acid in

- soluble extracts of *Euglena gracilis*. *J. Biol. Chem.*, **262** (26): 12541-12548.
- McLarnon-Riches, C. J., Rolph, C. E., Greenway, D. L. A. y Robinson, P. K. 1998. Effects of environmental factors and metals on *Selenastrum capricornutum* lipids. *Phytochemistry*, **49** (5): 1241-1247.
- Meijer, S. N., Ockenden, W. A., Sweetman, A., Breivik, K., Grimalt, J. O. y Jones, K. C. 2003. Global distribution and budget of PCBs and HCB in background surface soils: implication for sources and environmental processes. *Environ. Sci. Technol.*, **37** (4): 667-672.
- Meisch, H.-V., Hoffmann, H. y Reinle, W. 1983. Biosynthesis of chlorophyll precursors in green algae. Purification and characterization of L-glutamate: 4,5- dioxovaleric acid aminotransferase from *Chlorella fusca*. *Biochim. Biophys. Acta*, **743**: 281-289.
- Menone, M. L., Aizpun de Moreno, J. E., Moreno, V. J., Lanfranchi, A. L., Metcalfe, T. L. y Metcalfe, C. D. 2001. Organochlorine pesticides and PCBs in a southern Atlantic coastal lagoon watershed, Argentina. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **40** (3): 355-362.
- Metting Jr., F. B. 1996. Biodiversity and application of microalgae. *J. Ind. Microbiol.*, **17**: 477-489.
- Meulenbergh, R., Rijnaarts, H. H. M., Doddema, H. J. y Field, J. A. 1997. Partially oxidized polycyclic aromatic hydrocarbons show an increased bioavailability and biodegradability. *FEMS Microbiol. Lett.*, **152**: 45-49.
- Michielsen, C. C., van Loveren, H. y Vos, J. G. 1999. The role of the immune system in hexachlorobenzene-induced toxicity. *Environ. Health Perspect.*, **107** (5): 783-792.
- Mock, H. P., Trainotti, L., Kruse, E. y Grimm, B. 1995. Isolation, sequencing and expression of cDNA sequences encoding uroporphyrinogen decarboxylase from tobacco and barley. *Plant Mol. Biol.*, **28**: 245-256.
- Mock, H. P., Keetman, U., Kruse, E., Rank, B. y Grimm, B. 1998. Defense responses to tetrapyrrole-induced oxidative stress in transgenic plants with reduced Uroporphyrinogen decarboxylase or Coproporphyrinogen Oxidase Activity. *Plant Physiol.*, **116**: 107-116.
- Moore, J. W. y Ramamoorthy, S. 1984. Heavy metals in natural waters: Applied monitoring and impact assessment. *Springer-Verlag, New York.*, 268 pp.
- Moreno-Garrido, I., Lubián, L. M. y Soares, A. M. V. M. 2000. Influence of cellular density on determination of EC50 in microalgal growth inhibition tests. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **47**: 112-116.
- Mukerji, N. R. y Pimstone, N. R. 1992. Uroporphyrinogen decarboxylase from human erythrocytes: purification, complete separation, and partial characterization of two isoenzymes. *Int. J. Biochem.*, **24**: 105-119.
- Muñoz, M. J., Ramos, C. y Tarazona, J. V. 1996. Bioaccumulation and toxicity of hexachlorobenzene in *Chlorella vulgaris* and *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.*, **35**: 211-220.
- Nagalakshmi, N. y Prasad, M. N. V. 1998. Copper-induced oxidative stress in *Scenedesmus bijugatus*: protective role of free radical scavengers. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **61**: 623-628.
- Nassiri, Y., Mansot, J. L., Wery, J., Ginsburger-Vogel, T. y Amiard, J. C. 1997. Ultrastructural and electron energy loss spectroscopy studies of sequestration mechanisms of Cd and Cu in the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **33**: 147-155.
- Nishimura, K., Nakayashiki, T. y Inokuchi, H. 1993. Cloning and sequencing of the *hemeE* gene encoding uroporphyrinogen III decarboxylase (UPD) from *Escherichia coli* K-12. *Gene*, **133**: 109-113.
- Noda, K., Ohno, N., Tanaka, K., Kamiya, N., Okuda, M., Yadomae, T., Nomoto, K. y Shoyama, Y. 1996. A water-soluble antitumor glycoprotein from *Chlorella vulgaris*. *Planta Médica.*, **62**: 387-484.
- Noda, K., Ohno, N., Tanaka, K., Okuda, M., Yadomae, T., Nomoto, K. y Shoyama, Y. 1998. A new type of biological response modifier from *Chlorella vulgaris* which needs protein moiety to show an antitumor activity. *Phytother. Res.*, **12**: 309-319.
- Northcote, D. H., Goulding, K. J., Horne, R. W. y 1958 The chemical composition and structure of the cell wall of *Chlorella pyrenoidosa*. *Biochem. J.*, **70** (3): 391-397.
- Nyholm, N. y Källqvist, T. 1989. Methods for growth inhibition toxicity tests with freshwater algae. *Environ. Toxicol. Chem.*, **8**: 689-703.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. y Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, **95**: 351-358.
- Okai, Y. y Higashi-Okai, K. 1997. Potent anti-inflammatory activity of pheophytin a derived from edible green alga, *Enteromorpha prolifera* (Sujiao-Nori). *Int. J. Immunopharmac.*, **19** (6): 355-358.
- Okamoto, O. K., Pinto, E., Latorre, L. R., Bechara, E. J. H. y Colepicolo, P. 2001. Antioxidant modulation in response to metal-induced oxidative stress in algal chloroplasts. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **40**: 18-24.
- Okazaki, T., Kurumaya, K., Sagae, Y. y Kajiwara, M. 1990. Studies on the biosynthesis of corrinoids and porphyrinoids. IV. Biosynthesis of chlorophyll in *Euglena gracilis*. *Chem. Pharm. Bull.*, **38**: 3303-3307.
- Oparka, K. J. y Read, N. D. 1994. The use of fluorescent probes for studies of living plant cells. En: Harry, N. (ed.) *Plant Cell Biology. A practical approach*. Oxford University Press, Oxford, U.K.
- Patterson, G. L., Balwin, C. L., Bolis, C. M., Coplan, F. R., Karuso, H., Larsen, L. K., Levine, J. A., Moore, R. E., Nelson, C. S., Tschappat, K. D. y Tuang, G. D. 1991. Antineoplastic activity of cultured blue-green algae (Cyanophyta). *J. Phycol.*, **27**: 530-536.
- Paul, G. K., Matsumori, N., Murata, M. y Tachibana, K. 1995. Isolation and chemical structure of Amphidiriol 2, a

- potent hemolytic compound from marine dinoflagellate *Amphidinium blebsii*. *Tetrahedron Lett.*, **36** (35): 6279-6282.
- Pearse, A. G. E. 1986. Histochemistry theoretical and applied. *Williams Clowes Limited*. Churchill Livingstone, London.
- Pflugmacher, S. y Sandermann Jr., H. 1998. Cytochrome P₄₅₀ monooxygenases for fatty acids and xenobiotics in marine macroalgae. *Plant Physiol.*, **117**: 123-128.
- Phillips, J. D., Whitby, F. G., Kushner, J. P. y Hill, C. P. 1997. Characterization and crystallization of human uroporphyrinogen decarboxylase. *Protein Sci.*, **6**: 1343-1346.
- Pistocchi, R., Guerrini, F., Balboni, V. y Boni, L. 1997. Copper toxicity and carbohydrate production in the microalgae *Cylindrotheca fusiformis* and *Gymnodinium* sp. *Eur. J. Phycol.*, **32**: 125-132.
- Pistocchi, R., Mormile, A. M., Guerrini, F., Isani, G. y Boni, L. 2000. Increased production of extra- and intracellular metal-ligands in phytoplankton exposed to copper and cadmium. *J. Appl. Phycol.*, **12**: 469-477.
- Porra, R. J. 1997. Recent progress in porphyrin and chlorophyll biosynthesis. *Photochem. Photobiol.*, **65** (3): 492-516.
- Prasad, M. N. V., Drej, K., Skawinska, A. y Stratka, K. 1998. Toxicity of cadmium and copper in *Chlamydomonas reinhardtii* wild-type (WT 2137) and cell wall deficient mutant strain (CW 15). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **60**: 306-311.
- Pratt, R. 1941. Studies on *Chlorella vulgaris* IV. *Am. J. Bot.*, **28**: 492-497.
- Pratt, R. 1944. "Chlorellin" an antibacterial substance from *Chlorella*. *Science*, **99**: 351-352.
- Pratt, R. 1948. Studies on *Chlorella vulgaris*. XI. Relation between surface tension and accumulation of chlorellin. *Am. J. Bot.*, **35**: 634-637.
- Přibil, S. y Marvan, P. 1979. Batch cultivation. En: Marvan, P., Přibil, S. y Lhotsky, O. (eds.). *Algal assays and monitoring eutrophication*. Stuttgart: 175-180.
- Puel, F. Largeau, C. y Giraud, G. 1987. Occurrence of a resistant biopolymer in the outer walls of the parasitic alga *Prototheca wickerhamii* (Chlorococcales): ultrastructural and chemical studies. *J. Phycol.*, **23**: 649-656.
- Rai, L. C., Rai, P. K. y Mallick, N. 1996. Regulation of heavy metal toxicity in acid-tolerant *Chlorella*: physiological and biochemical approaches. *Environ. Exp. Bot.*, **36** (1): 99-109.
- Rama Devi, S. R. y Prasad, M. N. V. 1998. Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), a free floating macrophyte: response of antioxidant enzymes and antioxidants. *Plant Science.*, **138**: 157-165.
- Rapala, J., Sivonen, K., Luukkainen, R. y Niemelä, S. I. 1993. Anatoxin-A concentration in *Anabaena* and *Aphanizomenon* under different environmental conditions and comparison of growth by toxic and non-toxic *Anabaena*-strains - a laboratory study. *J. Appl. Phycol.*, **5**: 581-591.
- Rebeiz, C. A., Parham, R., Fasoula, D. A. y Ioannides, I. M. 1994. Chlorophyll a biosynthetic heterogeneity. *Ciba Found. Symp.*, **180**: 177-193.
- Reinbothe, S. y Reinbothe, C. 1996. The regulation of enzymes involved in chlorophyll biosynthesis. *Eur. J. Biochem.*, **237** (2): 323-343.
- Reynolds, E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, **17**: 208-212.
- Rice, E. L. 1984. Allelopathy. *Academic Press, London*, 422 pp.
- Riisgaard, H. U. y Hansen, S. 1990. Biomagnification of mercury in a marine grazing food-chain: algal cells *Phaeodactylum tricornutum*, mussels *Mytilus edulis* and flounders *Platichthys flesus* studied by means of a stepwise-reduction-CVAA method. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **62**: 259-270.
- Rijstenbil, J. W. y Gerringa, L. J. A. 2002. Interactions of algal ligands, metal complexation and availability, and cell responses of the diatom *Ditylum brightwellii* with a gradual increase in copper. *Aquat. Toxicol.*, **56**: 115-131.
- Ríos de Molina, M. C., Chaufan, G., Iglesias, S., Billi de Catabbi, S. y San Martín de Viale, L. C. 1996. Porphyrinogen carboxylase. Studies on the existence of isoenzymes. *Acta Physiol. Pharmacol. Ther. Latinoam.*, **46**: 265-275.
- Ríos de Molina, M. C., Corvi, M., Chaufan, G., Guidi, S. y San Martín de Viale, L. C. 1999. Detection of four isoforms for rat liver uroporphyrinogen decarboxylase. *An. Asoc. Quím. Arg.*, **87** (3/4): 121-125.
- Ríos de Molina, M. C., Wainstok de Calmanovici, R. y San Martín de Viale, L. C. 1980. Investigations on the presence of porphyrinogen carboxy-lyase inhibitor in the liver of rats intoxicated with hexachlorobenzene. *Int. J. Biochem.*, **12**: 1027-1032.
- Ríos de Molina, M. C., Wainstok de Calmanovici, R. y San Martín de Viale, L. C. 1987. Liver porphyrinogen carboxylase in hexachlorobenzene porphyric rats. Studies with intermediate porphyrinogens of series III and with uroporphyrinogen I. *Int. J. Biochem.*, **19** (4): 365-372.
- Rojicková-Padrťová, R. y Marsálek, B. 1999. Selection and sensitivity comparisons of algal species for toxicity testing. *Chemosphere.*, **38** (14): 3329-3338.
- Romana, M., Dubart, A., Beaupain, D., Chabret, C., Goossens, M. y Romeo, P. H. 1987. Structure of the gene for human uroporphyrinogen decarboxylase. *Nucleic. Acid Res.*, **15**: 7343-7356.
- Romeo, P. H., Raich, N., Dubart, A., Beaupain, D., Pryor, M., Kushner, J., Cohen-Solal, M. y Goossens, M. 1986. Molecular cloning and nucleotide sequence of a complete human uroporphyrinogen decarboxylase cDNA. *J. Biol. Chem.*, **261**: 9825-9831.
- Romero López, T. y Pérez Hernández, M. 1999. Grado de sensibilidad de organismos patógenos a la cuproclorofila.

- Bol. Ctro. Invest. Biol.*, **33** (1): 1-13.
- Roy, S., Lindström-Seppa, P., Huuskonen, S. y Hänninen, O. 1995. Responses of biotransformation and antioxidant enzymes in *Lemna minor* and *Oncorhynchus mykiss* exposed simultaneously to hexachlorobenzene. *Chemosphere* **30** (8): 1489-1498.
- Salvador, G. F. 1978. δ -aminolevulinic acid synthesis from γ - δ -dioxovaleric acid by acellular preparations of *Euglena gracilis*. *Plant Sci. Lett.* **13**: 351-355.
- Santana, M. A., Pihakaski-Maunsbach, K., Saudal, N., Marcker, K. A. y Smith, A. G. 1998. Evidence that the plant host synthesizes the heme moiety of teghemoglobin in root nodules. *Plant Physiol.*, **116**: 1259-1269.
- Schägger, H. y von Yagow, G. 1987. Tricine-SDS-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**: 368-379.
- Schiariti, A., Juárez, A.B. y Rodríguez, M.C. 2003. Effects of sublethal concentrations of copper on three strains of green microalgae under autotrophic and mixotrophic culture conditions. *Algol. Stud.*, **en prensa**.
- Schneegurt, M. A. y Beale S.I. 1988. Characterization of the RNA required for biosynthesis of δ -aminolevulinic acid from glutamate. *Plant Physiol.*, **86**: 497-504.
- Schön, A., Krupp, G., Gough, S., Berry-Lowe, S., Kannangara, C. G. y Söll, D. 1986. The RNA required in the first step of chlorophyll biosynthesis is a chloroplast glutamate t RNA. *Nature*, **322**: 281-284.
- Seki, Y., Kawanishi, S. y Sano, S. 1986. Uroporphyrinogen decarboxylase purification from chicken erythrocytes. *Meth. Enzymol.*, **123**: 415-421.
- Semple, K. T., Cain, R. B. y Schmidt, S. 1999. Biodegradation of aromatic compounds by microalgae. *FEMS Microbiol. Lett.*, **179**: 291-300.
- Sen, Ch. K., Sies, H. y Baeuerle, P. A. 2000. Antioxidant and redox regulation of genes. *Acad. Press*, California.
- Senthilkumar, K., Kannan, K., Subramanian, A. y Tanabe, S. 2001. Accumulation of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in sediments, aquatic organisms, birds, bird eggs and bat collected from south India. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, **8** (1): 35-47.
- Shahidi, F., Metusalach, J. y Brown, J. A. 1998. Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **38** (1): 1-67.
- Shihira, J. y Krauss, R.W. 1965. *Chlorella*. Physiology and taxonomy of forty-one isolates. *University of Maryland, College Park*: 1-92.
- Shioi, J., Nagamine, M y Sassa, T. 1984. Purification and properties of L-Alanine: 4,5-dioxovalerate aminotransferase from *Chlorella regularis*. *Arch. Biochem. Biophysics*, **234** (1): 117-124.
- Shrift, A. y Sproul, M. 1963. Sulfur nutrition and the taxonomy of *Chlorella*. *Phycologia*, **3**: 85-100.
- Sicko-Goad, L. y Stoermer, E. F. 1988. Effects of toxicants on phytoplankton with special reference to the Laurentian Great Lakes. En: *Evans, M.S. (Ed.) Toxic Contaminants and Ecosystem Health: A Great Lakes Focus. Advances in Environmental Sci and Technology. THODE.*, **21**: 19-52.
- Sigg, L., Behra, R., Boiler, M., Eggen, R., Meier, W., Sulzberger, B. y Xue, H. 1999. Relevance of copper inputs to natural waters. *EAWAG News.*, **46**: 9-11.
- Smith, I. 1963. Chromatographic and electrophoretic techniques. I. Chromatography. *Interscience Public*, New York, 617 pp.
- Smith, A. G. y Francis, J. E. 1987. Chemically-induced formation of an inhibitor of hepatic uroporphyrinogen decarboxylase in inbred mice with iron overload. *Biochem. J.* **246**: 221-226.
- Smith, A. G., Marsh, O. y Elder, G. H. 1993. Investigation of the subcellular location of the tetrapyrrole-biosynthesis enzyme coproporphyrinogen oxidase in higher plants. *Biochem. J.*, **292**: 503-508.
- Soeder, C. J. 1963. Weitere zellmorphologische und physiologische Merkmale von *Chlorella*-Arten. En: *Studies on microalgae and photosynthetic bacteria, Japanese Soc. Plant Physiol.*, Tokio: 21-34.
- Soeder, C.J., Schulze, G. y Thiele, D. 1967. Einfluss verschniedener kulturbedingungen auf das wachstum in synchronkulturen von *Chlorella fusca*. *Arch. Hydrobiol.*, **33**: 127-171.
- Sokal, R. y Rohlf, R. J. 1995. Biometry. *Freedman W.H. y Co. (eds.) Third Edition. San Francisco*.
- Stahl, E. 1965. Thin-Layer Chromatography. A. Laboratory Handbook. *Springer- Verlag, Berlin*, 553 pp.
- Stahl, E. y Jork, H. 1965. Terpene derivatives, essential oils, balsams and resins. En: Stahl, E. (ed.). *Thin-layer chromatography. A laboratory handbook*. Springer-Verlg, Berlin: 186-210.
- Starr, R. C. 1964. The culture collection of algae at Indiana University. *Am. J. Bot.*, **51**: 1013-1044.
- Stauber, J. L. 1995. Toxicity testing using marine and freshwater unicellular algae. *Aust. J. Ecotoxicol.*, **1**: 15-24.
- Stauber, J. L. y Florence, T. M. 1987. Mechanism of toxicity of ionic copper and copper complexes to algae. *Mar. Biol.*, **94**: 511-519.
- Stauber, J. L. y Florence, T. M. 1989. The effect of culture medium on metal toxicity to the marine diatom *Nitzschia closterium* and the freshwater green alga *Chlorella pyrenoidosa*. *Water Res.*, **23**: 907-911.
- Steel, R. G. y Torri, J. H. 1986. Bioestadística: principios y procedimientos. *Mc Graw-Hill, Bogotá, Colombia*.
- Stewart, W. D. P. 1974. Algal physiology and biochemistry. *Blackwell Sci. Publ. Oxford, London.*
- Straka, J. G. y Kushner, J. P. 1983. Purification and characterization of bovine hepatic uroporphyrinogen decarboxylase. *Biochemistry*, **22**: 4664-4672.

- Stratton, G. W. y Giles, J. 1990. Importance of bioassay volume in toxicity tests using algae and aquatic invertebrates. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **44**: 420-427.
- Strycek, T., Acreman, J., Kerry, A., Leppard, G. G., Nermut, M. V. y Kushner, D. J. 1992. Extracellular fibril production by freshwater algae and cyanobacteria. *Microb. Ecol.*, **23**: 53-74.
- Sunda, W. G. y Huntsman, S. A. 1998a. Interactions among Cu^{2+} , Zn^{2+} and Mn^{2+} in controlling cellular Mn, Zn and growth rate in the coastal alga *Chlamydomonas*. *Limnol. Oceanogr.*, **43** (6): 1055-1064.
- Sunda, W. G. y Huntsman, S. A. 1998b. Processes regulating cellular metal accumulation and physiological effects: Phytoplankton as model systems. *Sci. Total Environ.*, **219**: 165-181.
- Takeda, H. 1988a. Classification of *Chlorella* strains by cell wall sugar composition. *Phytochemistry*, **27** (12): 3823-3826.
- Takeda, H. 1988b. Clasification of *Chlorella* strains by means of the sugar components of the cell wall. *Biochem. Syst. Ecol.*, **16** (4): 367-371.
- Takeda, H. 1991. Sugar composition of the cell wall and the taxonomy of *Chlorella* (Chlorophyceae). *J. Phycol.*, **27** (2): 224-232.
- Takeda, H. 1993. Chemical Composition of cell walls as a taxonomical marker. *J. Plant. Res.*, **106**: 195-200.
- Takeda, H. 1995. Cell wall composition and taxonomy of symbiotic *Chlorella* from *Paramecium* and *Acanthocystis*. *Phytochemistry*, **40** (2): 457-459.
- Takeda, H. 1996. Diversity of cell-wall chemical composition and the taxonomy of algal. En: Chandhary, B. R. y Agrawal, S. B. (eds.). *Cytology, genetics and molecular biology of algae*. Acad. Press, Amsterdam: 291-300.
- Takeda, H. y Hirokawa, T. 1978. Studies on the cell wall of *Chlorella* I. Quantitative changes in cell wall polysaccharides during the cell cycle of *Chlorella ellipsoidea*. *Plant Cell Physiol.*, **19**: 591-598.
- Takeda, H. y Hirokawa, T. 1979. Studies on the cell wall of *Chlorella* II. Mode of increase of glucosamine in the cell wall during the synchronous growth of *Chlorella ellipsoidea*. *Plant Cell Physiol.*, **20**: 989-991.
- Takeda, H. y Hirokawa, T. 1984. Studies on the cell wall of *Chlorella*. I. Comparison of the cell wall chemical compositions in strains of *Chlorella ellipsoidea*. *Plant Cell Physiol.*, **25** (2): 287-295.
- Tam, N. F. Y., Wong, J. P. K. y Wong, Y. S. 2001. Repeated use of two *Chlorella* species, *C. vulgaris* and WW1 for cyclic nickel biosorption. *Environ. Pollut.*, **114**: 85-92.
- Tanaka, K., Yamada, A., Noda, K., Hasegawa, T., Okuda, M., Shoyama, Y. y Nomoto, K. 1998. A novel glycoprotein obtained from *Chlorella vulgaris* strain CK22 shows antimetastatic immunopotential. *Cancer Immunol. Immunother.*, **45**: 313-320.
- Tanaka, K., Yamada, A., Noda, K., Shoyama, Y., Kubo, C. y Nomoto, K. 1997. Oral administration of a unicellular green algae, *Chlorella vulgaris*, prevents stress- induced ulcer. *Planta Medica*, **63**: 465-466.
- Tang, J., Siegfried, B. D. y Hoagland, K. D. 1998. Glutathione S-transferase and in vitro metabolism of atrazine in freshwater algae. *Pest. Biochem. Physiol.*, **59**: 155-161.
- Taylor, C. B. 1998. Vampire Plants? *Plant Cell*, **10**: 1071-1073.
- Telitchenko, M. M. 1974. Hypothetical algotoxin and peroxidation of dissolved organic substances. *Gidrobiol. Zh.*, **10** (6): 97-107.
- Thies, F., Backhaus, T., Bossmann, B. y Grimme, L. H. 1996. Xenobiotic biotransformation in unicellular green algae. *Plant Physiol.*, **112**: 361-370.
- Tikoo, V., Scragg, A. H. y Shales, S. W. 1997. Degradation of pentachlorophenol by microalgae. *J. Chem. Tech. Biotech.*, **68**: 425-431.
- Tomio, J. M., García, R. C., San Martín de Viale, L. C. y Grintein, M. 1970. Porphyrin biosynthesis. VII. Porphyrinogen carboxy-lyase from avian erythrocytes. Purification and properties. *Biochim. Biophys. Acta*, **198**: 353-363.
- Tukaj, Z. 1989. The effect of fuel oil on the ultrastructure of the chlorococcal alga *Scenedesmus armatus*. *Protoplasma*, **151**: 47-56.
- Tukaj, Z. y Bohdanowicz, J. 1995a. Sensitivity to fuel diesel oil and cell wall structure of some *Scenedesmus* (Chlorococcales) strains. *Acta Soc. Bot. Pol.*, **64** (2): 139-147.
- Tukaj, Z. y Bohdanowicz, J. 1995b. Diesel-fuel-oil induced morphological changes in some *Scenedesmus* species (Chlorococcales). *Algol. Stud.*, **77**: 83-94.
- Turner, S. H. y Cherniak, R. 1981. Total characterization of polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydr. Res.*, **95**: 137-144.
- Turner, D. R., Whitfield, M. y Dickson, A. G. 1981. The equilibrium speciation of dissolved components in freshwater and sea water at 25° and 1 atm. Pressure. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **45**: 855-882.
- Ubogui, J. y Ficooseco, N. H. 1990. Ulceras por decúbito e hidroterapia en las termas de Copahue. *Arch. Argent. Dermat.*, **40**: 393-399.
- Ueno, R., Urano, N. y Suzuki, M. 2003. Phylogeny of the non-photosynthetic green micro-algal genus *Prototheca* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) and related taxa inferred from SSU and LSU ribosomal DNA partial sequence data. *FEMS Microbiol. Lett.*, **223**: 275-280.
- USEPA. 1994. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving water to freshwater

organisms. EPA 600/7, 91-002. Environmental Protection agency. Washington, DC.

- USEPA. 2002a. Effluent guidelines and standards. Toxic pollutants. *Code of federal Regulations 40 CFR 401.15*. U.S. Environmental Protection agency. Washington, DC.
- USEPA. 2002b. National recommended water quality criteria . EPA 822/R-02-012. U.S. Environmental Protection Agency. Washington, DC.
- Ustinova, I., Krienitz, L. y Huss, V. A. R. 2001. *Closteriopsis acicularis* (G.M.Smith) Belcher et Swale is a fusiform alga closely related to *Chlorella kessleri* Fott et Nováková (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Eur. J. Phycol.*, **36**: 341-351.
- Vavilin, D. V., Ducruet, J. M., Matorin, D. N., Venediktov, P. S. y Rubin, A. B. 1998. Membrane lipid peroxidation, cell viability and Photosystem II activity in the green alga *Chlorella pyrenoidosa* subjected to various stress conditions. *Photochem. Photobiol.*, **42**: 233-239.
- Vavilin, D. V., Polynov, V. A., Matorin, D. N. y Venediktov, P. S. 1995. Sublethal concentrations of copper stimulate photosystem II photoinhibition in *Chlorella pyrenoidosa*. *Plant Physiol.*, **146**: 609-614.
- Veerport, R. 1998. Exploitation of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug. *DDT*, **3** (5): 232-238.
- Vilas, G. L., Aldonatti, C., San Martín de Viale, L. C. y Ríos de Molina, M. C. 1999. Effect of α lipoic acid amide on hexachlorobenzene porphyria. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **47** (5): 815-823.
- Vinayakumar, M. y Kessler, E. 1975. Physiological and biochemical contributions to the taxonomy of the genus *Chlorella* X. Products of glucose fermentation. *Arch. Microbiol.*, **103**: 13-19.
- Vonshak, A. Ed. 1997. *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-Biology and Biotechnology*. Taylor & Francis, London., **233 pp**.
- Wang, D. C., Cooney, A., Demain, P., Dunnill, A., Humphrey, A. Y Lilly, M. 1979. Fermentation and enzyme technology. *Wiley InterSci.*, **97 pp**.
- Wang, W. Y., Huang, D. D., Stachon, D., Gough, S. P. y Kannangara, C. G. 1984. Purification, characterization and fractionation of the S-aminolevulinic acid synthesizing enzymes from lighth-grown *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *Plant Physiol.*, **74**: 569-575.
- Warburg, O. 1919. Über die Geschwindigkeit der Kohlensäure-zersetzung in lebenden Zellen. *Biochem. Z.* **100**: 230-70.
- Ward, M. A. 1970. Whole cell and cell-free hydrogenases of algae. *Phytochemistry.*, **9**: 259-266.
- Warshawsky, D., Cody, T., Radike, M., Reilman, R., Schumann, B., LaDow, K. y Schneider, J. 1995. Biotransformation of benzo(a)pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic analogs by several green algae and other alga species under gold and white light. *Chem. Biol. Interact.*, **97**: 131-148.
- Weinstein, J. D. y Beale, S. I. 1983. Separate physiological roles and subcellular compartments for two tetrapyrrole biosynthetic pathways in *Euglena gracilis*. *J. Biol. Chem.*, **258** (11): 6799-6807.
- Westall, J. C., Zachary, J. L. y Morel, F. M. 1976. MINEQL: A computer program for the calculation of chemical equilibrium composition of aquatic systems. *Tech. Note 18, R. M. Pearsons Laboratory for Water Resources and Environmental Engineering*, Cambridge, 91pp.
- Whitby, F. G., Phillips, J. D., Kushner, J. P. y Hill, C. P. 1998. Crystal structure of human uroporphyrinogen decarboxylase. *EMBO J.*, **17** (9):2463-2471.
- White, F. J. y James, P. W. 1985. A new guide to microchemical techniques for the identification of lichen substances. *Br. Lichen Soc. Bull.*, **57**.
- Wider de Xifra, E. A., Batlle, A. M. C. y Tigier, H. A. 1971. δ -Aminolevulinat synthetase in extracts of cultured soybean cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **235**: 511-517.
- Wilcox, L. W., Lewis, L. A., Fuerst, P. A. y Floyd, G. L. 1992. Assessing the relationship of autosporic and zoosporic chlorococcalean green algae with 18S rDNA sequence data. *J. Phycol.*, **28**: 381-386.
- Wilkinson, F. 1980. Chemical kinetics and reaction mechanism. *Van Nostrand Remhold Co. Ltd.*
- Wong, P. T. S. y Couture, P. 1986. Toxicity screening using phytoplankton. *En: Toxicity Testing Using Microorganisms*. CRC, Boca Raton, FL, USA: 79-100.
- Wong, S. L., Wainwright, J. F. y Pimenta, J. 1995. Quantification of total and metal toxicity in wastewater using algal bioassays. *Aquat. Toxicol.*, **31**: 57-75.
- Wood, J. M. 1974. Biological cycles for toxic elements in the environment. *Science* **183**: 1049-1052.
- Woods, J. S., Eaton, D. L. y Lukens, C. B. 1984. Studies on porphyrin metabolism in the kidney. Effects of trace metals and glutathione on renal uroporphyrinogen decarboxylase. *Mol. Pharmacol.*, **26**: 336-341.
- Woodruff, D. S. 2001. Declines of biomes and biotas and the future of evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **98**: 5471-5476.
- Wu, J. T., Hsie, M. T. y Kow, L. C. 1998. Role of proline accumulation in response to toxic copper in *Chlorella* sp. (Chlorophyceae) cells. *J. Phycol.*, **34**: 113-117.
- Wu, J., Chang, S-J. y Chou, T-L. 1995. Intracellular proline accumulation in some algae exposed to copper and cadmium. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, **36**: 89-93.

- Xue, H. B., Oestreich, A., Kistler, D. y Sigg, L. 1996. Free cupric ion concentrations and Cu complexation in selected Swiss lakes and rivers. *Aquatic Sci.*, **58** (1): 69-87.
- Xue, H., Nhat, P. H., Gächter, R. y Hooda, P. S. 2002. The transport of Cu and Zn from agricultural soils to surface water in small catchment. *Adv. Environ. Res.*, **en prensa** (prueba corregida disponible on line).
- Yamaguchi, K. 1997. Recent advances in microalgal bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites: a review. *J. Appl. Phycol.*, **8**: 487-502.
- Yamamoto, M., Nozaki, H., Miyazawa, Y., Koide, T. y Kawano, S. 2003. Relationship between presence of a mother cell wall and speciation in the unicellular microalga *Nannochloris* (Chlorophyta). *J. Phycol.*, **39**: 172-184.
- Yan, H. y Pan, G. 2002. Toxicity and bioaccumulation of copper in three green microalgal species. *Chemosphere*, **49**: 471-476.
- Yang, S., Ww, R. S. S. y Kong, R. Y. C. 2002. Biodegradation and enzymatic responses in the marine diatom *Skeletonema costatum* upon exposure to 2,4-dichlorophenol. *Aquatic Toxicol.*, **59**: 191-200.
- Zulpa, G., Zaccaro, M. C., Boccazzi, F., Parada, J. L. y Storni, M. 2003. Bioactivity of intra and extracellular substances from cyanobacteria and lactic acid bacteria on "wood blue stain" fungi. *Biol. Control*, **27**: 345-348.

AGRADECIMIENTOS

Hay mucha gente a la que deseo agradecer, lo cual significa que he tenido la suerte de que mucha gente me acompañara durante todo este tiempo.

Gracias a mis directoras, la Dra. María Susana Vigna y la Dra. María del Carmen Ríos de Molina, porque con gran idoneidad me han transmitido sus conocimientos, me han apoyado y me han guiado comprometidamente durante el desarrollo de este trabajo, haciendo posible que aprendiera mucho y que finalmente se concretara esta etapa.

Quiero agradecer, también, a toda la gente que, de una forma u otra, hizo posible que yo me iniciara y avanzara por el camino de la investigación, y que me acompañó y me sigue acompañando a lo largo de él:

Al Dr. Juan Accorinti, que fue el primero que me abrió las puertas de su laboratorio, me incorporó a su grupo, me inició, dirigió y formó durante mis primeros pasos en los que trabajamos en la línea de investigación sobre sustancias bioactivas en cultivos de microalgas verdes.

A Memo, por ser un amigo entrañable, por compartir sus enormes conocimientos sobre las algas y tantas otras cosas. Él es quien me introdujo en el mundo de los cultivos y las algas, me enseñó todo sobre ellas, me dirigió durante un largo período y me formó en la Ficología y en la Investigación.

A María del Carmen Ríos, quien me abrió las puertas de su laboratorio y me incorporó a su grupo. Ella me hizo descubrir una nueva línea de trabajo y despertó mi interés por la química biológica. Gracias a sus vastos conocimientos, su compromiso y su apoyo, aprendí mucho sobre la investigación y la química de los organismos y logré culminar esta importante etapa de mi carrera. Pero, sobre todas las cosas, aprendí lo que es trabajar bajo la dirección de una persona íntegra y comprometida con sus discípulos y con toda la comunidad de esta Facultad, con la que siempre pueden contar todos los que le solicitan su ayuda.

A mi queridísima Tere, por compartir conmigo sus conocimientos y trabajo. Pero, principalmente, por su apoyo, por su gran cariño y por ser una persona tan especial, que siempre se preocupa por los demás y se desvive por ayudarnos a todos.

A Ceci, por sus buenos consejos a nivel personal y laboral, por compartir sus conocimientos sobre la biología de las algas, por asesorarme durante distintas etapas de mis investigaciones y por compartir buenísimas experiencias de trabajo. Pero, sobre todas las cosas, por ser una gran persona y una gran amiga, con la que es un placer poder compartir el trabajo.

A María, una queridísima amiga, a la cual también debo agradecerle la provisión de las cepas de microorganismos utilizados durante los estudios de actividad biológica, así como su guía, sus enseñanzas, su asistencia y su trabajo durante el desarrollo de los antibiogramas.

A Josefina, con quien compartimos distintas etapas laborales y personales y quien, con sus divertidas charlas, siempre encuentra la forma de hacernos pasar un momento agradable.

A Anahí, Susi, Agustín, Sebastián, Silvina, con quienes, en distintas etapas, compartimos muchos momentos agradables de trabajo y relax.

A los chicos del laboratorio de María del Carmen, Gaby, Abel, Pampa, Martín, Liliana, que me recibieron en su grupo y siempre estuvieron dispuestos a ayudarme y tenderme una mano.

A Iara, Laura y Bibi, por compartir momentos amenos e intercambios de ideas y por haberme alentado y ayudado cada vez que lo necesitaba, ofreciéndome y poniendo a mi disposición sus conocimientos y el equipamiento de su laboratorio.

Gracias también:

A la Dra. Elisa Lombardo, por brindarme su tiempo y asesoramiento para realizar las determinaciones de actividad DOVAT.

A la Dra. Cecilia Rodríguez (Ceci), por las determinaciones químicas en los estudios de composición de la pared celular.

Al Dr. José Dadón, por su inestimable y paciente ayuda para realizar los análisis estadísticos. Por haberme prestado su valioso tiempo para que yo pudiera concretar estos análisis y por los sensatos consejos que me ha dado en más de una oportunidad.

A la Dra. San Martín de Viale, por permitirme el uso de los equipamientos de su laboratorio.

A la Lic. Gabriela Chaufan (Gaby), por la donación del anticuerpo anti UroD de rata.

A la Sra. Carmen Aldonatti, por su asistencia técnica durante las determinaciones de actividad UroD.

A la Sra. Isabel Farías, por la realización de las inclusiones para microscopía electrónica.

A las señoritas Gabriela y Florencia Molina, por la inmensa ayuda que me prestaron con el tipeo de la bibliografía. Con su valiosísima ayuda hicieron posible que el trabajo se concluyera a tiempo.

Al departamento de Biodiversidad y Biología Experimental y al departamento de Química Biológica, por permitirme el uso de sus instalaciones y equipamientos.

Quiero agradecer también a toda mi familia, por ser maravillosos y por ser quienes han guiado toda mi vida, determinando que yo llegara a ser la persona de hoy en día. Me siento orgullosa de poder dedicarles este trabajo que realicé con tanto esfuerzo y gracias a las posibilidades que ellos me brindaron siempre. Espero que esto también los haga sentir orgullosos a ellos:

A mis padres, quienes me enseñaron los valores importantes de la vida y me inculcaron el compromiso y la responsabilidad en el trabajo. Pero, por sobre todas las cosas, porque han sido un gran ejemplo de vida y los quiero mucho.

A mis queridos hermanos, Marina y Alejandro, con quienes compartimos tantas cosas hermosas en todas las etapas de nuestras vidas y con quienes agrandamos la familia a través de nuestros maravillosos hijos: Caro, Flori, Julián, Joaquín, Tobías, Nico y Agus.

A mis amados Jorge, Nico y Agus, que tuvieron que soportar que su esposa y madre, pasara por los locos tramos finales de la tesis y aguantar sus nervios y descuidos, esperando pacientemente que llegara el momento de normalidad. Por suerte, ellos saben cuanto los quiero y que son lo más importante para mí.

Finalmente, quisiera permitirme un agradecimiento a mi misma, porque a pesar de las malas pasadas que me jugaron las computadoras, las impresoras y la salud, finalmente lo logré y alcancé esta meta.